

Clostridium botulinum geeniaktiivisuus ja
neurotoksiinigeenien aktiivisuuteen
vaikuttavat tekijät

Sara Savolainen

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma
Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Helsingin yliopisto
Johtaja: Miia Lindström
Ohjaaja: François Douillard
2019



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto
Tekijä - Författare - Author Sara Savolainen		
Työn nimi - Arbetets titel - Title <i>Clostridium botulinum</i> geeniaktiivisuus ja neurotoksiinigeenien aktiivisuuteen vaikuttavat tekijät		
Oppiaine - Läroämne - Subject Elintarvikehygienia		
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatin tutkielma	Aika - Datum - Month and year 3/2019	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 54
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p><i>Clostridium botulinum</i> on elintarvikevälikkeen patogeeni, joka tuottaa voimakkainta tunnettua myrkyä botuliiniksi. Botuliini on hermomyrky, joka aiheuttaa botulismia sekä ihmisille että eläimille estämällä välittäjäaineen vapautumisen hermo-lihasliitoksessa. Hengityselimistöön edetessään botulismi on hoitamattomana mahdollisesti kuolemaan johtava sairaus. <i>C. botulinum</i> kannan ATCC 3502 botuliiniksiinikompleksi koostuu toksiiniosasta (BoNT/A1), nonhemagglutiniiniosasta (NTNH) ja kolmesta hemagglutiniiniosasta (HA-17, HA-33 ja HA-70). Toksiinikompleksin osia koodaavat geenit sijaitsevat samassa lokuksessa ja muodostavat kaksi erillistä operonia. Operonien välissä sijaitsee geeni (<i>botR</i>), joka koodaa toksiinituotantoa säätelevää BotR-sigmatekijää. <i>C. botulinum</i> tuottaa itiöitä, jotka ovat ympäristössä hyvin kestäviä. Itiöitymisen pääsääntelijänä toimii Spo0A, joka aktivoituessaan aktivoi edelleen sigmatekijäkaskadin. Tässä säätelykaskadissa emosolun puolella itiöitymistä ohjaavia rakennegeenejä säätelevät SigE ja SigK, ja esi-itiön puolella SigF ja SigG.</p> <p>Tutkimus koostui kahdesta eri osasta. Tutkimuksen metodologisessa osassa I oli tarkoituksena arvioida pienistä bakteeripopulaatioista saatavaa RNA-määrää ja sen laatua. RNA:n tutkimusmenetelmiin vaaditaan tyypillisesti suuria määriä hyvälaatuista RNA:ta, ja menetelmästä riippuen tarvittava määrä vaihtelee 200 nanogrammassa 5:een mikrogrammaan. Tarkoituksena oli selvittää, kuinka paljon bakteerisoluja tarvitaan RNA-sekvensointiin ja RT-qPCR-menetelmään. Tutkimuksessa käytetyt bakteerisolupelletit säilytettiin -70°C:ssa ja niistä eristettiin RNA.</p> <p>Tutkimuksen biologisessa osassa II oli tarkoituksena vertailla kahden eri <i>C. botulinum</i> ATCC 3502 -kannan isolaatin transkriptioprofiilia toksiinituotantoon ja itiöitymiseen liittyvien geenien osalta. Isolaattien transkriptioprofiilin avulla saatiin tietoa siitä, mitkä geenit ilmentyvät solussa tietyllä ajanhetkellä. ATCC 3502 -kannan isolaatti <i>tox</i>⁺ tuottaa botuliinia huomattavasti vähemmän. Neurotoksiinituotantokyvyn lisäksi myös isolaattien itiöitymiskyky tiedetään eroavan toisistaan. <i>Tox</i>⁺-isolaatin itiöitymiskyky on aikaisempien tutkimusten perusteella heikentynyt. <i>Tox</i>⁺- ja <i>tox</i>⁻-isolaattien aiempi genomianalyysi toi esiin tärkeitä eroavaisuuksia niiden genotyyppien ja fenotyyppien suhteen. <i>Tox</i>⁺-isolaatin vaihtoehtoista sigmatekijää BotR koodaavasta geenistä (<i>botR</i>) löydettiin geenin lukehkyksen muuttava insertiomutaatio.</p> <p>Molemmat isolaatit (<i>tox</i>⁺ ja <i>tox</i>⁻) kasvatettiin identtisissä olosuhteissa (anaerobinen TPGY-liemikasvatusalusta, 37 °C), ja bakteereiden eri kasvuvaiheista eristettiin solunäytteet. Bakteerisolusta eristettiin RNA, jonka perusteella valmistettua cDNA:ta käytettiin templaattina kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa RT-qPCR-analyysissä. RT-qPCR-menetelmän avulla tutkittiin kohdegeenien (<i>botA</i>, <i>ha33</i>, <i>spo0A</i>, <i>sigF</i>, <i>sigE</i> ja <i>sigG</i>) ilmentymistä bakteerin eri kasvuvaiheissa. Referenssigeeninä käytettiin <i>16S rRNA</i>:ta. Geenien esiintymiselle muodostettiin suhdeluvut, joiden perusteella isolaattien transkriptioprofiileja verrattiin toisiinsa.</p> <p>Tutkimuksen osion II tulokset osoittavat, että botuliinin rakennegeenien (<i>botA</i> ja <i>ha33</i>) ilmentyminen <i>tox</i>⁺-isolaatilla oli suurimmillaan 30–65-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa kuin <i>tox</i>⁻-isolaatilla. Tuloksen avulla voidaan selittää aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu ero isolaattien neurotoksiinituotannossa. <i>spo0A</i>-geenin ilmentyminen oli enimmillään noin 30-kertaisesti suurempaa <i>tox</i>⁺-isolaatilla kuin <i>tox</i>⁻-isolaatilla, mutta ero ei ollut näin suuri eikä tilastollisesti merkitsevä solupopulaatioiden kaikissa kasvuvaiheissa. Itiöitymisen sigmatekijöitä koodaavien geenien (<i>sigE</i>, <i>sigF</i> ja <i>sigG</i>) kohdalla erot isolaattien välillä olivat suurempia kuin <i>spo0A</i>-geenin kohdalla. Geenien ilmentyminen oli yleisesti 20–30-kertainen <i>tox</i>⁺-isolaatilla <i>tox</i>⁻-isolaattiin nähden. Saadun tuloksen avulla voidaan selittää isolaatin <i>tox</i>⁻ heikentynyt kyky itiöityä. Toksiinituotannolla ja itiöitymisellä on siten todennäköisesti yhteisiä säätelymekanismeja ja/tai -signaaleja. Mutaatio BotR sigmatekijässä todennäköisesti vaikuttaa myös itiöitymisen säätelyyn. On todennäköistä, että <i>C. botulinum</i> itiöitymisen säätelykaskadi osallistuu myös toksiinituotannon säätelyyn. Tutkimus antaa tärkeää lisätietoa <i>C. botulinum</i> itiöitymisen ja toksiinituotannon säätelystä saman kannan eri tavoin käyttäytyvillä solupopulaatioilla.</p> <p>Tutkimuksen osiosta I saatujen tulosten perusteella bakteerisolujen ja niistä eristettävän RNA-määrän välille saatiin standardisuora. Saatua tietoa voidaan hyödyntää RNA-sekvensoinnin ja RT-qPCR:n tutkimuskäytössä. Saatujen tulosten avulla voidaan laskea halutun RNA-massan perusteella soluviljelmään tarvittava bakteerisolumäärä, tai vastaavasti kuinka suuri määrä RNA:ta on mahdollista saada tietyn kokoisesta bakteerisolupopulaatiosta. Tutkimuksen osiosta II saatujen tulosten perusteella <i>C. botulinum</i> itiöitymisprosessi ja toksiinituotanto linkittyvät siis toisiinsa useaa eri reittiä pitkin, ja vaikuttavat näin toinen toisensa säätelyyn. Tärkeänä tekijänä niiden välillä useimmilla <i>C. botulinum</i> -kannoilla toimii vaihtoehtoinen sigmatekijä BotR, joka toksiinituotannon säätelyn lisäksi linkittyy myös itiöitymisprosessin säätelyyn mitä todennäköisimmin orpokinaasien välityksellä säätelemällä Spo0A:n fosforyloitumista.</p>		
Avainsanat - Nyckelord - Keywords <i>Clostridium botulinum</i> , botuliiniksiini, neurotoksiinituotanto, toksiinituotannon säätely, itiöityminen		
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto		
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare - Director and Supervisor(s) Johtaja: Miia Lindström, ohjaaja: François Douillard		

Sisällys

1	JOHDANTO.....	1
2	KIRJALLISUUSKATSAUS.....	3
2.1	Botulismi.....	3
2.1.1	Botulismien historiaa.....	3
2.1.2	Yleistä botulismista.....	3
2.1.3	Elintarvikevälikkeinen botulismi.....	6
2.1.4	Imeväisbotulismi.....	7
2.1.5	Haavabotulismi.....	8
2.1.6	Aikuisiän infektiivinen botulismi.....	9
2.1.7	Botuliinitoksiini-injektiosta aiheutuva botulismi.....	9
2.1.8	Yleistä botulismista eläimillä.....	9
2.2	<i>Clostridium botulinum</i>	10
2.2.1	Yleistä <i>Clostridium botulinumista</i>	10
2.2.2	Ryhmä I ja II.....	10
2.2.3	Ryhmä III.....	11
2.2.4	Ryhmä IV.....	11
2.3	Botuliinitoksiini.....	11
2.3.1	Toksiinityypit.....	11
2.3.2	Botuliinitoksiinin rakenne.....	13
2.3.3	Botuliinitoksiinin toiminta.....	14
2.3.4	Botuliinitoksiinin kliiniset sovellukset.....	15
2.4	Toksiinituotanto.....	16
2.4.1	Toksiinigeeniklusteri.....	16
2.4.2	Yleistä toksiinituotannon säätelystä.....	18
2.4.3	Ravintoaineiden ja ympäristötekijöiden vaikutus toksiinituotantoon.....	19
2.4.4	Bakteerikannan ja sen tuottaman toksiinityypin vaikutus toksiinituotantoon.....	20
2.4.5	Toksiinituotannon geneettisiä säätelymekanismeja.....	20
2.5	<i>Clostridium botulinum</i> in itiöityminen ja sen säätely.....	22
3	TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....	25
4	AINEISTO JA MENETELMÄT.....	26
4.1	Aineisto.....	26
4.1.1	Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat.....	26
4.1.2	Bakteereiden kasvatus ja kasvuolosuhteet.....	27
4.2	Menetelmät.....	28

4.2.1 Bakteerisolujen kerääminen.....	28
4.2.2 RNA:n eristäminen	28
4.2.3 RNA-konsentraation mittaaminen ja eheyden tarkastaminen	29
4.2.4 DNAasi-käsittely.....	29
4.2.5 cDNA-synteesi RNA:sta.....	29
4.2.6 RT-qPCR	30
5 TULOKSET	31
5.1 Bakteerisolujen ja niistä eristetyn RNA-määrän suhde	31
5.1.1 RNA:n konsentraatio ja puhtaus	31
5.1.2 RNA:n eheys.....	32
5.1.3 Solumäärän ja RNA:n välinen korrelaatio.....	33
5.2 ATCC 3502 –kannan isolaattien transkriptioprofiilien vertailu	35
5.2.1 Kasvukäyrät	35
5.2.2 RNA:n konsentraatio, puhtaus ja eheys	36
5.2.3 Standardikäyrät ja sulamispisteet.....	37
5.2.4 qPCR-alukeparien hyötysuhde	40
5.2.5 Geenien ilmenemisen kerrannaismuutokset	41
6 POHDINTA	51
7 KIITOKSET	55
8 LÄHTEET	56

1 JOHDANTO

Clostridium botulinum on tärkeä elintarvikevälitteinen patogeeni, joka tuottaa botuliinitoksiinia. Botuliinitoksiini on maailman voimakkaimpana tunnettu myrkky, joka aiheuttaa botulismia sekä ihmisille että eläimille. Botulismissa hermomyrkky botuliinitoksiini estää välittäjäaineen vapautumisen hermo-lihasliitoksessa. Hengityslihaksisstoon edetessään botulismi on mahdollisesti kuolemaan johtava sairaus, eikä siihen ole vielä kehitetty parantavaa hoitoa.

Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla kahden eri *C. botulinum* ATCC 3502 -kannan isolaatin (tox^+ ja tox^-) transkriptioprofiilia. Aikaisempien tutkimusten perusteella tiedettiin, että isolaattien neurotoksiinituotantokyky ja itiöitymiskyky eroavat toisistaan; isolaatti tox^- tuottaa neurotoksiinia huomattavasti vähemmän kuin isolaatti tox^+ , ja lisäksi sen itiöitymiskyky on heikentynyt. Isolaattien transkriptioprofiileja vertailemalla saatiin tietoa siitä, mitkä geenit ilmenevät bakteerisoluiissa niiden solusyklin eri vaiheissa, ja mikä isolaattien genotyypissä voisi mahdollisesti selittää niiden toisistaan eroavaa toksiinituotanto- ja itiöitymiskykyä. Genomianalyysin perusteella tiedettiin entuudestaan, että isolaatin tox^- -bakteeripopulaatio on pääosin mutatoitunut vaihtoehtoista sigmatekijää BotR koodaavan geenin (*botR*) osalta. Mutaatio on geenin lukukehyksen muuttava insertiomutaatio.

Botuliinitoksiinikompleksin osia koodaavat geenit sijaitsevat samassa lokuksessa ja muodostavat kaksi erillistä operonia, joiden välissä sijaitsee geeni *botR*. Toksiinityypin A toksiinikompleksi koostuu toksiiniosasta (BoNT/A1), nonhemagglutiniiniosasta (NTNH) ja kolmesta hemagglutiniiniosasta (HA-17, HA-33 ja HA-70). Botuliinin rakenneosia koodaavista geeneistä tutkimukseen valittiin geenit *botA* ja *ha33*, koska ne sijaitsevat saman lokuksen eri suuntiin luettavissa operoneissa.

C. botulinum tuottaa ympäristössä hyvin säilyviä itiöitä. Itiöitymisen pääsäätelijä on Spo0A, joka aktivoituessaan aktivoi edelleen sigmatekijäkaskadin, ja käynnistää näin ollen koko itiöitymisprosessin. Kyseisessä säätelykaskadissa emosolun puolella itiöitymistä ohjaavia rakennegeenejä säätelevät sigmatekijät SigE ja SigK, ja esi-itiön

puolella sigmatekijät SigF ja SigG. Itiöitymistä säätelevistä geeneistä tutkimukseen valittiin itiöitymisprosessin pääsäätelijää Spo0A koodaava geeni (*spo0A*) ja sigmatekijöitä SigF, SigE ja SigG koodaavat geenit (*sigF*, *sigE* ja *sigG*). Sigmatekijää SigK koodaava geeni (*sigK*) jätettiin pois tutkimuksesta, koska sen alukkeet eivät toimineet tutkimuksen vaatimalla tavalla.

On todennäköistä, että *C. botulinum*in toksiinituotanto- ja itiöitymisprosesseilla on yhteisiä säätelymekanismeja ja/tai -signaaleja. Todennäköisesti itiöitymisen säätelykaskadi osallistuu myös toksiinituotannon säätelyyn. *Tox*-isolaatin vaihtoehtoisesta sigmatekijästä BotR löytynyt insertiomutaatio vaikuttaa todennäköisesti myös itiöitymisen säätelyyn toksiinituotannon ja itiöitymisen yhteisten säätelymekanismien kautta.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Botulismi

2.1.1 Botulismien historiaa

Vuonna 1817 Justinus Kerner (1786–1862) julkaisi ensimmäisen tarkan kliinisen kuvauksen 230:lla ihmisellä esiintyneestä halvaannuttavasta sairaudesta (Hatheway 1992, Erbguth 1998, Torrens 1998). Hän uskoi, että infektion lähteeksi osoittautuneet makkarat sisälsivät myrkyllistä ainetta, ja nimesi myrkytyksen botulismiksi, josta tuli ilmoitettava sairaus (Torrens 1998). Bakterin hän nimesi *Bacillus botulinukseksi* (Hatheway 1992). Vuonna 1897 van Ermengem julkaisi ensimmäisenä kuvauksen bakteerista, joka aiheutti taudinpurkaukset, ja eristi *C. botulinumin* ruuasta (Hatheway 1992, Torrens 1998).

Kun taudinpurkauksia jatkossa tutkittiin, selvisi, että osalla toksiineista oli keskenään erilaiset serologiset ominaisuudet, ja aiheuttajabakteerien fysiologiset ominaisuudet olivat vaihtelevia (Hatheway 1992). Aiheuttajille yhteistä oli kuitenkin aina anaerobisuus ja itiöiden muodostaminen (Hatheway 1992). Myöhemmin bakteeri sijoitettiin *Clostridium*-sukuun, joka pitää sisällään kaikki anaerobiset itiöitä muodostavat sauvabakteerit lukuun ottamatta *Desulfotomaculum*-sukua (Hatheway 1992).

2.1.2 Yleistä botulismista

Botulismien voivat aiheuttaa *C. botulinumin* ja sen lähisukua olevien bakteereiden, kuten *Clostridium butyricumin* ja *Clostridium baratiin* tuottamat neurotoksiinit. Botulismi on botuliinitoksiinin aiheuttama halvaannuttava sairaus, ja lähes kaikki sen aiheuttamat oireet voidaan selittää pääasiassa hermostossa tapahtuvan motoneuronien ja parasympaattisen hermoston toiminnan estymisellä (Burgen ym. 1949).

Botulisman kliiniseen oirekuvaan kuuluvat pääasiassa asetyylikoliinierityksen estymisestä aiheutuvat neurologiset oireet hermolihaskriittisissä (Schantz & Johnson 1992). Botulismi sairautena on samankaltainen riippumatta siitä, mikä toksiniityppi on kyseessä. Botulisman kliinisiä muotoja ihmisellä ovat elintarvikevälitteinen botulismi, imeväisbotulismi, haavabotulismi, aikuisiän infektiivinen botulismi ja botuliinitoksiini-injektioista aiheutuva botulismi. Ihmisille botulisman aiheuttavat toksiniityypit A, B, E ja F (Sakaguchi 1982, Green ym. 1983). Eläimille botulisman tyypillisesti aiheuttaa joko C- tai D-tyypin toksini (Bengtson 1922, Seddon 1922, Theiler 1927). Tyypin G toksinia ei ole yhdistetty botulismitapauksiin (Shapiro ym. 1998).

Botulismi on usein vaikea diagnosoida, koska se voi muistuttaa monia muita sairauksia. Botulisman nopea havaitseminen on erityisen tärkeää potilaan toipumisen kannalta. Tehokas hoito tulisi saada aloitettua mahdollisimman pian, ja näin ollen olisikin tärkeää, että lääkärit osaisivat epäillä botulismia potilaan oirekuvan perusteella. Botulisman diagnosoiminen liittyy pääasiassa botuliinin havaitsemiseen potilaassa (Lindström & Korkeala 2006). Diagnoosi varmistetaan potilaasta ja/tai vehikkelistä löytyvien toksinia tuottavien bakteerien perusteella (Lindström & Korkeala 2006). *C. botulinum* –soluviljelmää ja toksinin osoittamista varten näytteitä otetaan potilaan seerumista ja ulosteesta (Schantz & Johnson 1992). Elintarvikevälitteisen botulisman diagnosoimiseksi seerumin ja ulosteen lisäksi tutkitaan mahdolliset tartuntalähteenä toimineet elintarvikkeet, ja haavabotulismia epäiltäessä viljellään *C. botulinumin* mahdollisesti kolonisoiman haavan erite (Hauschild & Gauvreau 1985, CDC 1995, Werner ym. 2000, Mazuet ym. 2015).

Botulisman varmistavat testit liittyvät pääasiassa botuliinitoksiinin havaitsemiseen hiirimallissa, mutta testi voi antaa myös joissakin tapauksissa virhenegatiivisen tuloksen (Rosen ym. 2015). Esimerkiksi joissakin imeväisbotulismitapauksissa diagnoosiin voi riittää *C. botulinumin* löytyminen potilaan ulosteesta tai suoliston sisällöstä, vaikka itse toksinia ei havaittaisikaan potilaasta otetuista näytteistä (CDC 1997). Hiiritestin lisäksi muita diagnostisia menetelmiä botuliinitoksiinin havaitsemiseen ovat immunologiset määritysmenetelmät, joista ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) –testi on käytetyin (Lindström & Korkeala 2006). Massaspektrometriaa voidaan myös käyttää eri toksiniityppien havaitsemiseen ja tunnistamiseen. Tutkimuksessa Barr ym. 2005 toksiniityppien A, B, E ja F tunnistamiseen käytettiin apuna niiden

endopeptidaasiaktiivisuutta. Eri toksiinityypit voitiin tunnistaa massaspektrometrialla kullekin toksiinille spesifisten SNARE-proteiinien (SNAP-25 tai VAMP) pilkkomistuotteiden avulla (Barr ym. 2005). Lisäksi DNA:n havaitsemiseen perustuvia molekyyli tekniikoita, kuten erilaisia PCR (polymerase chain reaction) –menetelmiä voidaan käyttää diagnostiikkaan (Lindström & Korkeala 2006).

Vakavat botulismitapaukset voivat johtaa hengityslihasten halvaantumiseen, joka aiheuttaa hengityksen lamaantumisen ja kuoleman. Riippumatta siitä, mitä kautta toksiini pääsee elimistöön, se päätyy verenkiertoon ja aiheuttaa näin potilaalle hengenvaaran (Midura 1996). Botulismiin sairastuneen potilaan hoidossa tärkeimpiä tekijöitä ovatkin hengityksen turvaaminen ja tehokas tukihoito (Swedberg ym. 1987). Potilaan letkuruokinta voi myös olla tarpeen nielemisvaikeuksien yhteydessä.

Saatavilla oleva lisensoitu hevosen antitoksiini toimii kaikkia seitsemää toksiinityyppeä A-G vastaan (CDC 2010). Antitoksiinin antamisesta potilaalle hyvissä ajoin on osoitettu olevan apua verenkierrossa olevien botuliinitoksiinimolekyylien neutraloimisessa ja parantavan potilaan mahdollisuuksia selvitä (Tacket ym. 1984). Myös aikuisiän infektiivisen botulismiin hoidossa antitoksiinista voi olla hyötyä potilaan toipumiselle (Griffin ym. 1997). Potilaan verenkierrosta hermostoon siirtynyttä toksiinia ei kuitenkaan voida enää neutraloida.

Täydellinen toipuminen botulismista on mahdollista, jos potilas pääsee tehohoitoon. Botulismin aiheuttama kuolleisuus on vähentynytkin huomattavasti tehokkaan tukihoidon ja elintoimintojen koneellisen ylläpitämisen ansiosta. Nykyään sairastapauksista johtaa kuolemaan kehittyneissä maissa 5–10 % (Sobel ym. 2004). Kun potilaan hengityksen turvaamiseen koneellisesti ei ollut vielä mahdollisuutta, kuolleisuus botulismiin oli jopa n. 60% (Shapiro ym. 1998). Botulismista toipuvalla potilaalla hermo-lihasliitokset palautuvat vähitellen uusien hermopäätteiden ja hermo-lihasliitosten muodostumisen seurauksena.

Rokotteen kehittämisestä ja maailmanlaajuisesta käyttämisestä saatavat hyödyt ovat kyseenalaisia, sillä botulismi on sairautena harvinainen. Suojautuminen sitä vastaan voisi kuitenkin tulla kyseeseen esimerkiksi puolustusvoimien keskuudessa bioterrorismilta suojautumiseen, sillä botuliinitoksiinin käyttöön bioaseena liittyy potentiaalinen uhka.

Lisäksi botuliinitoksiinin kanssa tekemisissä olevia laboratoriotyöntekijöitä on rokotettu botuliinia vastaan.

2.1.3 Elintarvikevälitteinen botulismi

Elintarvikevälitteinen botulismi on botulismin tunnetuin muoto, missä jo elintarvikkeeseen muodostunut botuliinitoksiini niellään, ja se pääsee imeytymään suolistosta verenkiertoon. *C. botulinum* itiöitä esiintyy kaikkialla maaperässä ja vesistöissä. Tämän vuoksi elintarvikkeet kontaminoituvat itiöillä ja niitä niellään ruuan mukana. Ei ole kuitenkaan varmaa, onko pelkkien itiöiden nieleminen yksinään riittävää aiheuttamaan botulismia, sillä ruuansulatuskanavan normaalimikrobisto estää normaalitilanteessa patogeenien kolonisoitumista suolistoon (Rosow & Strober 2015).

Elintarvikevälitteistä botulismia esiintyy, kun elintarvikkeiden säilömisprosesseissa kuumuutta kestävät itiöt selviytyvät ja pääsevät germinoitumaan ja tuottamaan neurotoksiinia anaerobisissa olosuhteissa. Otollisimmat olosuhteet bakteerin kasvuille on elintarvikkeissa, jotka viilennetään matalalämpöisen kuumennuskäsittelyn jälkeen ja säilytetään sen jälkeen pitkiä aikoja huoneenlämmössä (Peck 2006). Ruuan liian lyhyt valmistusaika, liian alhaiset valmistuslämpötilat sekä säilyttäminen huoneenlämmössä lisäävät riskiä toksiinien muodostumiselle elintarvikkeeseen. Elintarvikkeen riittämätön viilentäminen edesauttaa erityisesti ryhmän II bakteerien itiöiden selviämistä ja germinaatiota. Ryhmän I bakteerien itiöt eivät lähtökohtaisesti selviä elintarvikkeiden kylmäketjussa. Botuliinitoksiini tuhoutuu ja sen myrkyllisyys häviää, kun sitä keitetään 79 °C:ssa 20 minuutin ajan, tai vähintään 85 °C:ssa 5 minuutin ajan (Woodburn ym. 1979).

Suurin osa elintarvikevälitteisistä botulismitapauksista yhdistetään kotona säilötyihin elintarvikkeisiin ja perinneruokien valmistusmenetelmiin (Hauschild & Gauvreau 1985, Sobel ym. 2004). Elintarvikevälitteiseen botulismiin on yhdistetty vehikkeleinä mm. kotona valmistettu kinkku, kaupallinen juustokastike, vakuumpakattu lämminsavulohi, paikallisesti valmistettu juusto, kotona valmistettu tomaattikastike, erilaisia maitotuotteita, säilykeoliivit ja alumiinifolioon käärityt uuniperunat (Hauschild & Gauvreau 1985, Roblot ym. 1994, Townes ym. 1996, Lindström ym. 2010, Jalava ym. 2011, Rafie ym. 2017).

Tyypilliset ensimmäiset oireet elintarvikevälikteisessä botulismitartunnassa ovat pahoinvointi, oksentelu, ummetus ja mahakrampit (Cuetter & El-Feky 1999, Proverbio ym. 2016). Näitä oireita seuraavat yleensä asteittain 1–2 vuorokauden sisällä neurologiset oireet, kuten suun kuivuminen, sekä nielemis- ja puhevaikeudet (Cuetter & El-Feky 1999, Mazuet ym. 2015, Proverbio ym. 2016). Taudin edetessä pidemmälle seuraa artikulaatiovaikeuksia, hengenahdistusta ja perifeeristä lihasheikkoutta (Cuetter & El-Feky 1999, Proverbio ym. 2016). Suuressa osassa tapauksista esiintyy silmäoireita, kuten kahtena näkeminen, silmäluomien roikkuminen, näkökentän epätarkkuus ja laajentuneet pupillit (Cuetter & El-Feky 1999, Mazuet ym. 2015, Proverbio ym. 2016). Symmetrinen ja etenevä lihasheikkous tai halvaantuminen ilman tuntoaistin katoamista ovat tyypillisiä oireita botulismille. Botulismia sairastavalla henkilöllä ei tyypillisesti ole kuumetta, ja tietoisuus säilyy täysin normaalina myös halvaantumisjakson aikana (Cuetter & El-Feky 1999, Proverbio ym. 2016). Tukihoitoon ja antitoksiinin antamisen lisäksi elintarvikebotulismitapauksissa potilaalle suoritetusta mahahuuhtelusta voi olla hyötyä, jos kontaminoitunutta ruokaa on vielä mahdollisesti potilaan mahalaukussa.

2.1.4 Imeväisbotulismi

Imeväisbotulismitapauksia on raportoitu toksiinityyppien A, B, E ja F aiheuttamina (Morris ym. 1983, Hatheway & McCroskey 1987, Arnon ym. 2008). Imeväisbotulismia esiintyy alle 1-vuotiailla lapsilla, joiden suolistomikrobisto ei ole vielä täysin kehittynyt (Rosow & Strober 2015). Tämä mahdollistaa *C. botulinum* kolonisoitumisen suolistoon, jossa se pääsee tuottamaan toksiinia (Derman ym. 2014, Rosow & Strober 2015). Kliinisissä oireissa on paljon tapauskohtaista vaihtelua lähes oireettomasta eriasteisiin halvausoireisiin, ja jopa akuuttiin kuolemaan (Arnon 1980, Midura 1996, Nevas ym. 2005). Imeväisbotulismissa tyypillisiä oireita ovat ummetus, huonosyöntisyys, uneliaisuus, vaimea itku, imemis- ja nielemisvaikeudet sekä etenevä lihasheikkous (Morris ym. 1983, Shapiro ym. 1998).

Riskitekijöitä imeväisbotulismille näyttäisivät olevan mm. noin 2 kuukauden ikä, ja erityisesti hunajan syöminen (Morris ym. 1983). Valtaosassa imeväisbotulismitapauksista itiöiden lähde on tuntematon, mutta oletettavasti se on joko maaperä tai huonepöly (Dabritz ym. 2014). Imeväisbotulismin hoidossa ei käytetä

hevosen antitoksiinia, koska sen käyttöön liittyy anafylaktisen reaktion riski. Sen sijaan imeväisbotulisman hoidossa on mahdollista käyttää ihmisen botulismivasta-aineita sisältävää lääkevalmistetta BIG-IV (Arnon ym. 2008). Pääasiallinen hoito perustuu kuitenkin tukihoitoon.

2.1.5 Haavabotulismi

Haavabotulisman yleisimpiä oireita ovat hengenahdistus, nielemisvaikeudet, näköhäiriöt, artikulaatio-ongelmat, etenevä halvaantuminen ja hengityksen toiminnan vajuus (Elston ym. 1991, Burningham ym. 1994). Haavabotulismia voi esiintyä haavapotilailla, kun tulehtuneeseen haavaan muodostuu anaerobiset olosuhteet, jotka mahdollistavat *C. botulinum* -itiöiden germinaation, bakteerisolujen jakautumisen ja toksini tuotannon, sekä toksinin imeytymisen verenkiertoon.

Haavabotulismitapauksia on raportoitu esimerkiksi avoimen murtuman komplikaationa, puremahaavoissa, päävammojen ja hammaspaiseiden yhteydessä (Elston ym. 1991, Werner ym. 2000, Tiedeken ym. 2014). Lisäksi haavabotulismia on raportoitu useissa tapauksissa suonensisäisiä ja nenän limakalvoille annosteltavia (skin popping) huumeita käyttävien potilaiden keskuudessa (MacDonald ym. 1985, CDC 1995). Haavabotulismissa ei esiinny ruuansulatuskanavaoireita, ja taudin inkubaatioaika on pidempi kuin elintarvikevälitteisessä botulismissa; noin 4–13 vuorokautta (Tiedeken ym. 2014). Haavabotulismitapauksissa positiivinen näyte saadaan varmimmin haavaerite- tai kudospölystä (CDC 1995, Werner ym. 2000). Haavabotulisman kohdalla tulehtunut haava tulisi tuoreistaa kauttaaltaan, ja aloittaa potilaalle tukihoidon lisäksi antibioottihoito (Burningham ym. 1994). Swenson ym. 1980 osoittivat, että kaikki heidän tutkimuksessa käyttämänsä toksinityypit A-G tuottavat *C. botulinum* -kannat olivat herkkiä tetrasyklinille, metronidatsolille ja kloramfenikolille. Lisäksi he osoittivat, että suurin osa (90%) testatuista kannoista oli herkkiä myös mm. erytromysiinille, penisilliinille, rifampiinille ja klindamysiinille (Swenson ym. 1980). Poikkeuksen teki nonproteolyyttinen F-toksiinia tuottava kanta, joka oli kohtalaisen resistentti penisilliinille (Swenson ym. 1980).

2.1.6 Aikuisiän infektiivinen botulismi

Harvinaisissa tapauksissa *C. botulinum* voi aiheuttaa aikuisella imeväisbotulisman kaltaista suoliston kolonisaatiota ja toksinin tuottamista elimistöön (Griffin ym. 1997). Aikuisiän infektiiviseen botulismiin sairastuvilla potilailla on usein taustalla esimerkiksi vatsaontelokirurginen toimenpide tai suoliston mikrobiston toimintaa häiritsevä antibioottihoito (Chia ym. 1986, McCroskey & Hatheway 1988). Raportoitujen tapausten aiheuttajina ovat olleet yleisimmin toksinityypit A ja B, mutta myös tyypin F toksinin on raportoitu toimineen aiheuttajana (McCroskey & Hatheway 1988, McCroskey ym. 1991).

2.1.7 Botuliinitoksiini-injektiosta aiheutuva botulismi

Yleistynyttä botulisman kaltaista oireyhtymää voi esiintyä sivuoireena potilailla, joiden neuromuskulaarisia tai muita lihaksistoon liittyviä sairaustiloja on hoidettu botuliinitoksiini-injektioilla (Bakheit ym. 1997). Kauneudenhoitoon käytettävien lisensoimattomien botuliini-injektioiden on myös raportoitu aiheuttaneen botulismia (Chertow ym. 2006).

2.1.8 Yleistä botulismista eläimillä

Suurin osa selkärangaisista eläimistä on herkkiä botuliinitoksiinille ja voi sairastua botulismiin samoin kuin ihmiset (Critchley 1991). Eläinten kohdalla taudinpurkaukset ovat joskus hyvinkin mittavia, ja saattavat suurimmillaan käsittää jopa kymmeniätuhansia yksilöitä (Sakaguchi 1982). Eläimille botulisman tyypillisesti aiheuttavat joko C- tai D-toksinityypit (Bengtson 1922, Seddon 1922, Theiler 1927). Tyypin E toksinia on eristetty mm. luonnonvaraisista linnuista ja kaloista sekä kalankasvatuslaitoksen taimenista (Hielm ym. 1998, Hannett ym. 2011). Sikojen on todettu voivan toimia kantajina tyypin B toksinia tuottaville *C. botulinum* -kannoille (Myllykoski ym. 2006).

Riskitekijänä tuotantoeläinten botulismitapauksille toimivat mm. säilörehun suojamuovipakkaukset, jotka mahdollistavat *C. botulinumille* suotuisat kasvu- ja lisääntymisolosuhteet (Notermans ym. 1981). Naudoille botulisman voivat aiheuttaa

myös toksiinityyppi A ja toksiinityyppi B (Notermans ym. 1981, Schocken-Iturrino ym. 1990). Naudoilla botulisman hoidossa on todettu olevan eniten hyötyä lääkehiilestä, probiooteista sekä AD₃E-vitamiinin ja hivenaineiden annostelusta (Pandian ym. 2015).

Suurin osa hevosten botulismitapauksista on toksiinityypin B aiheuttamia (Whitlock & McAdams 2006). Sairastuneet hevoset pidetään tallilevossa ja niitä tukihoidetaan oireiden mukaisesti (Whitlock & McAdams 2006). Lisäksi botulisman hoidossa hevosilla käytetään antitoksiinia (Whitlock & McAdams 2006). Ennuste on yleensä hyvä, jos hevonen on vielä jaloillaan hoidon alkaessa (Whitlock & McAdams 2006).

2.2 *Clostridium botulinum*

2.2.1 Yleistä *Clostridium botulinumista*

C. botulinum on anaerobinen ja itiöitä muodostava bakteeri. Klostridit ovat Gram-positiivisia bakteereita, vaikkakin useisiin eri kantoihin on myös havaittu ilmestyvän Gram-negatiivisia bakteereita solupopulaation vanhetessa (Hatheway 1992). Botuliinitoksiinia tuottavat *Clostridium botulinum* –bakteerit luokitellaan ryhmiin I, II, III ja IV. Niiden lisäksi botuliinitoksiinia tuottaa osa *Clostridium butyricum* ja *Clostridium baratii* –bakteereiden kannoista (Hatheway 1992). Jotkin botuliinitoksiinia tuottavista kannoista tuottavat vain yhtä toksiinityyppiä, mutta on myös kantoja, jotka tuottavat kahta tai jopa kolmea eri toksiinityyppiä (Franciosa ym. 1997, Simpson 1981, Kalb ym. 2014).

2.2.2 Ryhmä I ja II

C. botulinum ryhmään I ja II kuuluvien bakteerien tuottamat toksiinit ovat pääasiallisesti vastuussa ihmisillä ilmenevistä botulismitapauksista. Ryhmään I kuuluvat bakteerit ovat metabolialtaan proteolyyttisiä, eli ne hajottavat proteiineja, ja niiden optimaalinen kasvulämpötila on n. 37 °C (Hatheway 1992). Ne tuottavat toksiineja A, B tai F (Hatheway 1992). Ryhmään I kuuluvien bakteerien tuottamat itiöt kestävät ryhmien I–IV itiöistä korkeimpia lämpötiloja, ja tuhoutuvat n. 110 °C:een lämpötilassa (Hatheway 1992, Barash & Arnon 2014).

Ryhmän II bakteerit ovat metaboliaaltaan nonproteolyyttisiä (Hatheway 1992). Niille optimaalinen kasvulämpötila on n. 30 °C tai sitä matalampi, ja ne kykenevät kasvamaan myös jääkaappilämpötiloissa (Hatheway 1992). Ryhmään kuuluvien bakteerien tuottamat itiöt sietävät heikosti lämpöä ja tuhoutuvat n. 80 °C:een lämpötilassa (Hatheway 1992). Ryhmän II bakteerit tuottavat joko B-, E- tai F-toksiinia (Hatheway 1992).

2.2.3 Ryhmä III

Ryhmän III bakteerit ovat pääasiassa nonproteolyyttisiä, ja niiden toksisuus on bakteriofagivälitteistä (Hatheway 1992). Ryhmään kuuluvien bakteereiden optimaalinen kasvulämpötila on n. 40 °C. Niiden tuottamat itiöt kestävät vähemmän lämpöä kuin ryhmän I itiöt, mutta kuitenkin enemmän kuin ryhmän II itiöt, ja tuhoutuvat n. 100 °C:een lämpötilassa (Hatheway 1992). Ryhmän bakteerit tuottavat joko C- tai D-tyypin toksinia (Hatheway 1992). Ryhmän III bakteerien toksinit ovat pääasiallisesti vastuussa useiden eri eläinlajien botulismitapauksista.

2.2.4 Ryhmä IV

Ryhmään IV kuuluvat bakteerit ovat proteolyyttisiä ja ne tuottavat tyypin G toksinia (Hatheway 1992). Ryhmään kuuluvien bakteerien optimaalinen kasvulämpötila on n. 37 °C, ja itiöiden lämmönkestävyys on sama kuin ryhmän III bakteereilla (Hatheway 1992). Ryhmän IV bakteereita ei ole yhdistetty eläimillä eikä ihmisillä ilmenneisiin botulismitapauksiin. Kyseisiä kantoja on löydetty maailmalta vähän, lähinnä Argentiinasta (Suen ym. 1988). Perustuen niiden muista ryhmistä (I–III) eriyvään fenotyyppiin onkin ehdotettu, että ryhmään IV kuuluvat bakteerit nimetään omaksi lajikseen: *Clostridium argentinenseksi* (Suen ym. 1988).

2.3 Botuliinitoksiini

2.3.1 Toksiinityypit

Botuliinitoksiini on tunnettu maailman myrkyllisimpänä aineena. Toksiinit voidaan jakaa seitsemään serotyyppiltään erilaiseen päätoksiinityypiin: A, B, C, D, E, F ja G, ja useisiin

eri alatyyppeihin, jotka voivat erota toisistaan ominaisuuksiensa puolesta (Hatheway 1992, Smith ym. 2005, Raphael ym. 2008). Lisäksi viime aikoina raportoitiin uudesta botuliinitoksiinityypistä, joka julkaistiin aluksi serotyyppinä H, mutta osoitettiin myöhemmin serotyyppien A ja F hybridiksi (Dover ym. 2014, Maslanka ym. 2016).

Eri serotyyppien rakenteista ja farmakologisista ominaisuuksista löytyy paljon yhtäläisyyksiä (Hatheway 1992). Eri toksiinityyppien (A-G) geenisekvensseistä on löydetty eroavaisuuksia enimmillään 32% (BoNT/F) ja vähimmillään 2,6% (BoNT/E) aminohappotasolla (Smith ym. 2005). Lisäksi toksiiniserotyyppin A alatyyppeiden BoNT/A1 ja BoNT/A2 välillä ero aminohappotasolla on 10%, ja niiden kohdalla onkin havaittu selkeä ero mm. toksiinin sitoutumisvoimakkuudessa sekä vasta-aineen tarttumisessa toksiiniin, ja näin ollen toksiinimolekyylin neutraloitumisessa (Smith ym. 2005). Jacobson ym. 2008 totesi myös tutkimuksessaan, että toksiinigeeniklusteriin kuuluvien geenien sekvensseissä esiintyy huomattavia eroavaisuuksia aminohappotasolla *C. botulinum* serotyyppi A:n alatyypeillä.

Ihmisillä botulismien aiheuttamisesta vastaavat toksiinityypit A, B ja E. Eläimillä esiintyvistä taudinpurkauksista vastaavat taas yleensä toksiinityypit C ja D (Shapiro ym. 1998). Tyypin G toksiinia ei ole yhdistetty ihmisten eikä eläinten tautitapauksiin. Alun perin geenit tyypin A, B, E ja F toksiineille havaittiin olevan kromosomaalisia (Zhou ym. 1995). Viimeaikaisissa tutkimuksissa plasmidissa sijaitsevia toksiinigeenejä on kuitenkin raportoitu nonproteolyttisella serotyyppillä B, alatyypeillä A3, B1, B2, E1, sekä kahta eri toksiinia tuottavilla alatyypeillä Ab, Ba ja Bf (Marshall ym. 2007, Smith ym. 2007, Franciosa ym. 2009, Hill ym. 2009, Umeda ym. 2009, Zhang ym. 2013).

70-luvun alkupuolella C- ja D-toksiinityyppien geenien havaittiin olevan bakteriofagivälitteisiä, ja viimeaikaiset tutkimukset ovat lisäksi osoittaneet, että niiden profagit esiintyvät suurina plasmideina (Eklund ym. 1972, Sakaguchi ym. 2005, Skarin ym. 2011). Profagi on bakteerin genomien osaksi integroitunut viruksen genomi. Tyypin G neurotoksiinigeenit sijaitsevat plasmidissa (Zhou ym. 1995).

Lisäksi neurotoksiinityyppejä E tuottavan *C. butyricum*, ja neurotoksiinityyppejä F tuottavan *C. baratii* on todettu voivan aiheuttaa ihmisille botulismia (Hall ym. 1985, Suen ym. 1988). Molempien organismien tuottamat toksiinit on yhdistetty myös joihinkin

imeväisikäisten botulismitapauksiin (Hall ym. 1985, McCroskey ym. 1986, Hatheway & McCroskey 1987).

Toksiinigeenit voivat todennäköisesti siirtyä eri kantojen välillä, koska useat eri klostridilajit voivat tuottaa neurotoksiinia, ja joillakin bakteerikannoilla on genomissaan yhdistelmä eri toksiinityypin geenejä (Hatheway 1992, Collins & East 1998). Jotkut kannat, joilla on genomissaan kaksi eri toksiinityypin geeniä, muodostavat vain yhtä aktiivista toksiinia (Peck ym. 2011). Kahta eri aktiivista toksiinityppiä muodostavilla kannoilla taas toinen toksiinityppi on yleensä hallitseva, ja sitä muodostetaan suurempia määriä (Peck ym. 2011).

Botuliinitoksiinin ohella myrkyllisimpinä tunnetuihin aineisiin kuuluu *Clostridium tetaniin* tuottama tetanustoksiini (TeTx) (Montecucco & Schiavo 1993). Botuliinitoksiinilla on tetanustoksiinin kanssa paljon samankaltaisia ominaisuuksia. Botuliinitoksiinin ja tetanustoksiinin rakenteet muistuttavat toisiaan, ja tetanustoksiinin toimintamekanismi on hyvin samankaltainen botuliinitoksiinin eri serotyyppien kanssa (Montecucco & Schiavo 1993). Botuliinin aiheuttaman velttohalvauksen sijaan tetanustoksiini aiheuttaa potilaalle spastisen halvaustilan (Montecucco & Schiavo 1993).

2.3.2 Botuliinitoksiinin rakenne

Kaikki neurotoksiinityypit ovat molekyylipainoltaan ja yleiseltä rakenteeltaan yhteneväisiä, vaikka ne eroavatkin geneettisesti toisistaan. Botuliinitoksiinit muodostuvat yksittäisistä polypeptidiketjuista, jotka ovat molekyylimassaltaan 150 kDa. Toksiinissa on rikkisillalla toisiinsa kiinnittyneinä kaksi erillistä osaa; raskas ketju (noin 100 kDa) ja kevyt ketju (noin 50 kDa) (DasGupta & Sugiyama 1972). Raskas ketju koostuu kahdesta erillisestä toiminnallisesta osasta; C- ja N-terminaalista (Rossetto ym. 2014). C-terminaali osallistuu neurotoksiinin kiinnittymiseen hermosoluun, ja N-terminaali osallistuu kevyen ketjun siirtymiseen endosytoottisen vesikkelin kalvon välityksellä hermosolun solulimaan (Rossetto ym. 2014).

2.3.3 Botuliinitoksiinin toiminta

Botuliinitoksiini estää asetyylikoliinin vapautumisen kolinergisistä eli asetyylikoliinia erittävistä hermopäätteistä (Simpson 1981). Toksiini aiheuttaa näin ollen hermolihaskramppeihin palautumattomia muutoksia, jotka estävät sen normaalin toiminnan (Simpson 1980). Esimerkiksi toksiinityypin A toiminta hermopäätteessä voidaan jakaa kolmeen eri vaiheeseen; sitoutumisvaiheeseen, siirtymisvaiheeseen ja välittäjäaineen kulkeutumisen estämisvaiheeseen (Simpson 1980, Brin 1997).

80-luvun alussa tiedettiin, että sitoutumisvaiheessa toksiini kiinnittyy solukalvolle omaan reseptoriinsa (Simpson 1980, Simpson 1981). Montecucco 1986 esitti tutkimuksessaan, että toksiinin sitoutumiseen liittyy jonkinlainen kaksoisreseptori. Myöhemmin onkin havaittu, että toksiinityyppi G sitoutuu Synaptotagmin I ja II (Syt-I ja Syt-II) –reseptoreihin (Rummel ym. 2004). Toksiinityyppi C:n on todettu sitoutuvan kahteen eri gangliosidireseptoriin GD1b ja GT1b (Tsukamoto ym. 2005). Toksiinityyppi B sitoutuu myös kahteen eri reseptoriin, Synaptotagmin II (Syt-II) ja gangliosidireseptoriin GD1a (Berntsson ym. 2013). Toksiinin kolmiulotteinen rakenne sitoutuu molempiin reseptoreihin samanaikaisesti (Berntsson ym. 2013). Toksiinimolekyyliin A tiedetään pääsevän solukalvon läpi sitoutumalla synaptiseen vesikkeliin toimivaan glykoproteiiniin (SV2C) (Dong ym. 2006, Mahrhold ym. 2006). Myös toksiinityypin D on havaittu pääsevän solukalvon läpi SV2:n avulla, mutta tunnistusmekanismiin tiedetään eroavan toksiinityypin A ja E vastaavista (Peng ym. 2011). Toksiinityyppi E sitoutuu solukalvolla SV2A- ja SV2B –reseptoreihin (Dong ym. 2008). Neurotoksiinityyppi F vaatii gangliosidireseptorin, sekä lisäksi se sitoutuu SV2 –reseptoriin (Rummel ym. 2009, Fu ym. 2009). Sitoutuminen on palautumaton tapahtuma, ja mitä enemmän toksiinimolekyyliä sitoutuu, sitä vähemmän aikaa vaaditaan potilaan halvausoireiden kehittymiseen (Simpson 1980). Sitoutumisvaiheen jälkeen seuraa toksiinin siirtymisvaihe hermosolun solukalvon läpi solulimaan (Simpson 1980).

Siirtymisvaiheen jälkeen toksiinimolekyyli pilkkoutuu rikkisillan hajoamisen ja proteolyysin seurauksena useisiin stabiileihin osiin, ja kevyt ketju läpäisee solukalvon raskaan ketjun N-terminaalien avulla (Simpson 1981, Brin 1997). Kevyen ja raskaan ketjun välinen rikkisilta on tärkeässä osassa toksiinin soluun pääsemisessä, koska jos se katkeaa liian aikaisin, toksiini ei pääse solukalvon läpi ja sen toksiset ominaisuudet

häviävät lähes kokonaan (Brin 1997). Toksiinin siirtyminen solukalvon läpi ei vielä itsessään aiheuta halvausoireita, koska vasta tämän jälkeen seuraa pilkkomisvaihe, joka estää välittäjäaineen kulkeutumisen (Simpson 1980).

Toksiini ja sen kaksi pääosaa ovat liian suuria päästäkseen solukalvon läpi diffuusiolla, joten ne tarvitsevat hermosoluun päästäkseen aktiivisen kuljetusmekanismin, kuten endosytoosin tai vesikkelikuljetuksen (Simpson 1980). Kevyt ketju sisältää sinkkiosan, ja sillä on kyky toimia endopeptidaasina (Rossetto ym. 2014). Aktivoituessaan hermosolun sisällä se näin ollen pilkkoo välittäjäaineen eksosytoosiin tarvittavia SNARE-proteiineja (esim. SNAP-25 ja VAMP) hermosolun vesikkelikuljetusmekanismista, minkä seurauksena asetyylikoliinin vapautuminen hermolihasliitoksessa estyy (Rossetto ym. 2014). Eri neurotoksiinit pilkkovat eri alueita kyseisistä proteiineista (Rossetto ym. 2014). SNAP-25-proteiineja pilkkovat botuliinitoksiinin serotyypit A ja E, ja VAMP-proteiineja pilkkovat B, E, F ja G (Binz ym. 1994, Yamasaki ym. 1994). Tyypin C1 toksiini pilkkoo syntaxin-proteiineja (Blasi ym. 1993). Toksiini voi vaikuttaa välittäjäaineen vapautumisalueella tai sen välittömässä läheisyydessä (Simpson 1980).

2.3.4 Botuliinitoksiinin kliiniset sovellukset

Botuliinitoksiinia käytetään usealla eri lääketieteen alalla; mm. neurologiassa ja oftalmologiassa (Münchau & Bhatia 2000). Toksiinin toimiminen asetyylikoliinin vapautumisen estäjänä voi helpottaa monien spastisten ja dystonisten sairauksien oireita (Münchau & Bhatia 2000). Lisäksi botuliinitoksiini-injektio vaikuttaisi tulevaisuudessa olevan tehokas apu myös neuropaattisten eli hermovauriokiputilojen, ja kroonisen migreenin hoidossa (Grazzi & Usai 2014, Oh & Chung 2015). Botuliinitoksiini on erittäin selektiivinen, minkä vuoksi sen käytössä ilmenee vähän sivuvaikutuksia. Yksi botuliinitoksiini A –valmisteista tunnetaan maailmanlaajuisesti nimellä BOTOX (Allergan) (Brin 1997).

2.4 Toksiinituotanto

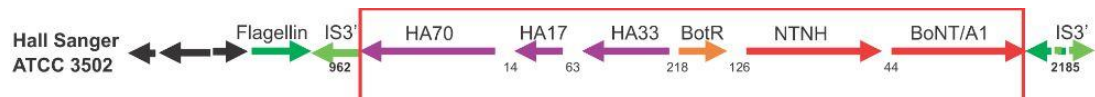
C. botulinum tuottaa myrkyllisimpänä tunnettua ainetta botuliinitoksiinia. Botuliinitoksiini estää asetyylikoliinin vapautumisen potilaan hermo-lihasliitoksessa, ja aiheuttaa potilaalle velttohalvauksen eli botulismin. Botuliinitoksiinit jaetaan seitsemään erilaiseen päätoksiinityyppiin. Ryhmän I bakteerit tuottavat A-, B- tai F-toksiinia, ryhmän II bakteerit B-, E- tai F-toksiinia, ryhmän III bakteerit C- tai D-toksiinia, ja ryhmän IV bakteerit G-toksiinia. Kuhunkin toksiiniin kuuluvat proteiiniosat koodataan bakteerin genomissa olevan toksiinigeeniklusterin perusteella.

2.4.1 Toksiinigeeniklusteri

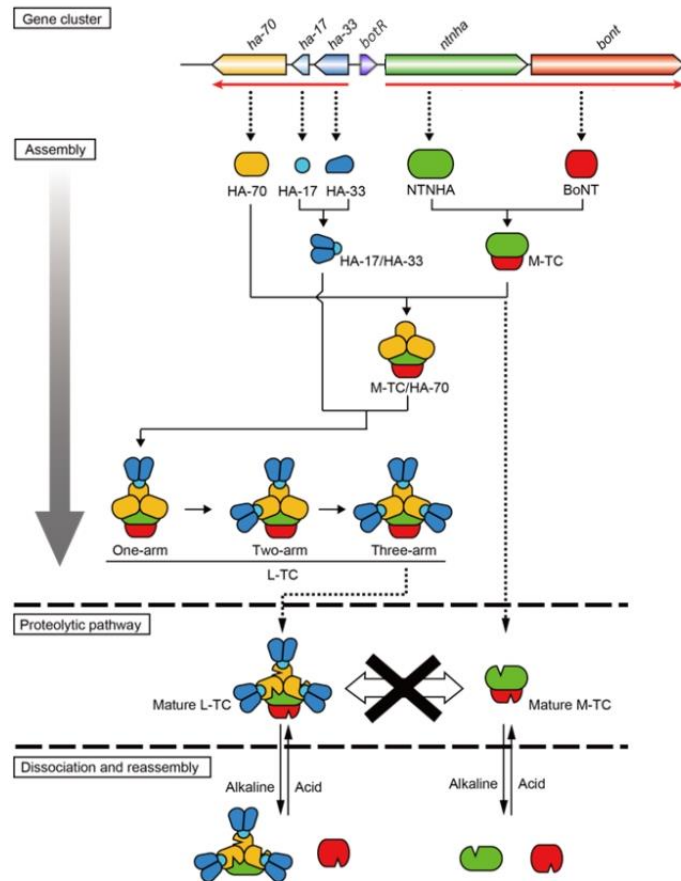
Botuliinitoksiinimolekyyliin kuuluu useita eri proteiineja, joita koodaavat geenit muodostavat yhdessä toksiinigeeniklusterina tunnetun kokonaisuuden (Raffestin ym. 2004). Toksiinigeeniklusteri koodaa kahdesta seitsemään proteiinia, jotka muodostavat toksiinikompleksin (Raffestin ym. 2004). Toksiinigeeniklusterit eroavat toisistaan toksiinin serotyypistä riippuen (Raffestin ym. 2004). Toksiinigeeniklusterin sisältämät geenit muodostavat kaksi toisistaan erillään olevaa polykistronista operonia, joista toinen operoni sisältää *ntnh*- ja *bont*-geenit ja toinen *ha*-geenit (*ha-17*, *ha-33* ja *ha-70*) (Henderson ym. 1996). Vaihtoehtoinen säätelytekijä BotR sijaitsee operonien keskellä *C. botulinum*in serotyypin A, B, F ja G genomissa (East ym. 1996, Bhandari ym. 1997).

Tutkimuksessamme käytettävä *C. botulinum* –kanta tuottaa botuliinitoksiiniserotyypin A alatyypin A1. Alatyypin A1 (BoNT/A1) geeniklusteri sisältää hemagglutiniinigeenit *ha70*, *ha17*, *ha33* ja toksiinituotannon vaihtoehtoista sigmatekijää BotR koodaavan geenin *botR*, nontoksisen nonhemagglutiniinigeenin *ntnh* ja toksiinigeenin *boNT/A1* (kuva 1, kuva 2) (Raffestin ym. 2004). BoNT eli itse toksiiniosa saa aikaan botuliinin myrkylliset ominaisuudet. Hemagglutiniiniosien (HA-17, HA-33 ja HA-70) tehtävänä on suojella toksiinimolekyyliä ruuansulatuskanavassa, ja auttaa sitä läpäisemään suoliston seinämä (Matsumura ym. 2008). Hemagglutiniiniosien tapaan myös NTNH-apukompleksi suojaa toksiinimolekyyliä mm. pH:n ja proteaasin vaikutuksilta, ja näin ollen hajoamiselta ruuansulatuskanavassa (Matsumura ym. 2008).

BoNT ja NTNH muodostavat yhdessä M-PTC:ksi (minimally functional progenitor toxin complex) kutsutun kokonaisuuden, joka yhdessä HA-proteiinien kanssa auttaa toksiinimolekyyliä läpäisemään suoliston seinämän (Ito ym. 2011). M-PTC vaikuttaisi olevan dynaaminen kokonaisuus, joka pystyy tarpeen mukaan protoninsiirtoreaktioihin ympäristön pH:n perusteella (Gu ym. 2012). Tämän seurauksena BoNT ja NTNH ovat tiiviisti toisiinsa sidottuna, kun toksiinimolekyyliä tarvitsee suojata matalalta pH:lta mahalaukussa, ja toisaalta toksiinimolekyyli pystytään vapauttamaan kompleksista suoliston seinämän läpi verenkiertoon ympäristön pH-muutoksen seurauksena (Gu & Jin 2013).



Kuva 1 Toksiinityypin A toksiinigeeniklusteriin kuuluvat hemagglutiniinigeenit *ha70*, *ha17*, *ha33*, vaihtoehtoista säätelytekijää *BotR* koodaava geeni *botR*, nonhemagglutiniinigeeni *ntnh* ja toksiiniosaa koodaava toksiinigeeni *boNT/A1*. Kuva muokattu, lähde: Smith ym. 2007.



Kuva 2 Toksiinigeeniklusterissa hemagglutiniinigeenit (*ha-17*, *ha-33* ja *ha-70*) koodaavat botuliinin hemagglutiniiniosia (HA-17, HA-33 ja HA-70), *ntnh*-geeni koodaa NTNHA- eli nonhemagglutiniiniosaa, *botR* koodaa vaihtoehtoista sigmatekijää BotR ja *boNT* koodaa toksiinikompleksin toksiiniosaa BoNT. Kuva muokattu, lähde: Sagane ym. 2012.

2.4.2 Yleistä toksiinituotannon säätelystä

Botuliinitoksiinituotantoa säätelevistä ja siihen vaikuttavista tekijöistä saadaan jatkuvasti uutta tietoa. Botuliinitoksiinigeenin ilmentäminen on riippuvaista bakteerin kasvuvaiheesta (Bradshaw ym. 2004). Toksiinigeeniklusterin transkriptio lisääntyy eksponentiaalisen kasvun vaiheessa ja suurimmillaan se on eksponentiaali- ja stationaarivaiheen välillä (Bradshaw ym. 2004). Toksiinituotanto laskee voimakkaasti stationaarivaiheessa (Bradshaw ym. 2004). Bakteerin kasvuvaiheen lisäksi itse toksiinituotannon käynnistymiseen ja tuotetun toksiinin määrään *C. botulinumilla* vaikuttavat mm. saatavilla olevat ravintoaineet ja ympäristöolosuhteet, bakteerikanta ja tuotetun toksiinin serotyyppi, sekä lukuisat säätelytekijät ja geneettiset säätelymekanismit.

2.4.3 Ravintoaineiden ja ympäristötekijöiden vaikutus toksiinituotantoon

Tiettyjen saatavilla olevien hiilihydraatti-, typpi- ja aminohappolähteiden tiedetään vaikuttavan botuliinitoksiinituotannon määrään. Saatavilla olevan glukoosin tiedetään lisäävän botuliinitoksiinimuodostusta (Bonventre & Kempe 1959). Useiden eri aminohappojen kuten arginiinin, proliinin ja glutamaatin on esitetty vähentävän toksiinituotantoa (Patterson-Curtis & Johnson 1989, Leyer & Johnson 1990, Fredrick ym. 2017).

Botuliinitoksiinituotantoa vähentää korkea arginiinitaso *C. botulinum* Hall A– ja Okra B –kannoilla (Patterson-Curtis & Johnson 1989). Tämän lisäksi myös typpipitoisten arginiinijohdannaisien ravintoaineiden ja tryptofaanin on todettu vähentävän toksiinituotantoa *C. botulinum* –serotyyppi E:llä (Leyer & Johnson, 1990). Laboratoriolosuhteissa käytetyllä kasvualustalla on huomattu myös olevan vaikutusta tuotetun botuliinitoksiinin määrään, mikä liittyy todennäköisesti saatavilla oleviin ravinteisiin ja ympäristöolosuhteisiin (Bradshaw ym. 2004).

Ympäristötekijöistä myös lämpötilalla on todettu olevan vaikutusta *C. botulinum* Hall A –kannan toksiinituotantoon. Molempien toksiinigeeniklusterin operonien (*ntnh-botA* ja *ha33-ha17-ha70*) transkription on todettu vähentyvän ATCC 3502 –kannalla voimakkaasti, kun bakteerit kasvavat lämpötilassa 45 °C verrattuna kasvuun 39 °C:ssa (Selby ym. 2017). *C. botulinum* serotyyppi E:n optimaalinen kasvulämpötila on n. 30 °C. Tutkimuksessa Chen ym. 2008 geenin *botE* mRNA-tason todettiin olevan samanlainen optimaalisessa kasvulämpötilassa sekä 10 °C:een lämpötilassa. Geenin *botE* mRNA-taso ei myöskään havaittu laskevan juurikaan 8 vuorokauden inkubaation aikana 10 °C:ssa (Chen ym. 2008). Näin ollen kyseiset bakteerit kykenevät tuottamaan toksiinia myös jääkaappilämpötiloissa, mikä on riskitekijä elintarvikehygienian osalta.

Kohotetulla hiilidioksidipitoisuudella ei ole todettu olevan merkittävää vaikutusta toksiinigeenien ilmentämiseen eikä itse toksiinin muodostamiseen *C. botulinum*in tyypin A-toksiinia tuotavalla ATCC 3502 –kannalla (Artin ym. 2010). Tästä poiketen kuitenkin nonproteolyttisillä kannoilla, jotka tuottavat toksiineja B ja E, hiilidioksidipitoisuuden kohoaminen kasvuympäristössä lisäsi bakteereiden toksiinituotantoa (Artin ym. 2008).

Artin ym. 2010 ja Artin ym. 2008 tutkimuksissa käytettävät hiilidioksidipitoisuudet olivat 10%, 35% ja 70%.

2.4.4 Bakteerikannan ja sen tuottaman toksiinityypin vaikutus toksiinituotantoon

Bakteerin kanta ja sen tuottama toksiinityppi vaikuttavat myös tuotetun toksiinin määrään ja voimakkuuteen. Erityisesti serotyyppiä A tuottavat ja muut proteolyttiset kannat, jotka tuottavat serotyypin B- tai F-toksiinia, tuottavat enemmän botuliinitoksiiniproteiinia verrattuna muihin serotyyppeihin C, D, F ja G (Boroff 1955, Schantz & Johnson 1992). Tyypin A toksiinia pidetään voimakkaampana kuin toksiinityyppejä B ja E, ja sen aiheuttama botulismi on myös kestoaltaan pidempi (Foran ym. 2003).

2.4.5 Toksiinituotannon geneettisiä säätelymekanismeja

botR-geeni koodaa vaihtoehtoista sigmatekijää, joka kontrolloi sekä *ntnh-botA* – että *ha* –operonien transkriptiota (Marvaud ym. 1998). Geenit, jotka ovat vastuussa itiöitymisestä, solun hajoamisesta ja proteolyttisestä aktivoitumisesta, ovat myös todennäköisesti tärkeässä roolissa biologisesti aktiivisen toksiinin tuottamisessa (Bradshaw ym. 2004, Mascher ym. 2017).

CodY on Gram-positiivisten bakteereiden transkriptionaalinen geenisäätelijä. CodY:n on todettu vaikuttavan botuliinitoksiinigeenien ekspressioon *C. botulinum* ATCC 3502 -kannalla (Zhang ym. 2014). CodY:n inaktivaatio vähensi toksiinigeenin *botA* ekspressiota, ja näin ollen myös toksiinituotantoa (Zhang ym. 2014). Vastaavasti *codY*-geenin liiallisen geeniekspression todettiin lisäävän kannan neurotoksiinituotantoa (Zhang ym. 2014). CodY todennäköisesti säätelee positiivisesti *botR*-geenin ilmenemistä silloin, kun olosuhteet saatavilla olevien ravintoaineiden suhteen ovat suotuisat (Ihekweba ym. 2016).

TCS (two-component signal transduction system) –geeniparien on todettu osallistuvan neurotoksiinituotannon säätelyyn *C. botulinum* tyypin A kannalla (Connan ym. 2012). *C. botulinum* tyypin A genomista on löydetty 28 geeniparia, joiden oletetaan

muodostavan yhdessä luettavan TCS:n (Sebahia ym. 2007). Suoranaisesti toksiinigeenien ekspression säätelyyn näyttää osallistuvan vähintään kolme TCS –geeniparia: CLC_1093/CLC_1094, CLC_1914/CLC_1913 ja CLC_0661/CLC_0663 (Connan ym. 2012).

TCS:hen kuuluva CBO0787/CBO0786 –geenipari blokkaa toksiinigeeniklusterin promoottorialueen tarttumalla siihen, ja näin ollen vähentää botuliinitoksiinin tuotantoa (Zhang ym. 2013). Tämän lisäksi TCS CBO1042/CBO1041 ja -CBO1967/CBO1968 näyttäisivät osallistuvan toksiinituotannon positiiviseen säätelyyn reagoimalla solujen väliseen signaalointiin (Ihekwaba ym. 2016). Ihekwaban ym. 2016 tutkimus perustuu laskennalliseen mallintamiseen.

C. botulinum ryhmän I kantojen genomista on löydetty kaksi erillistä *agr*-lokusta (*agr-1* ja *agr-2*), jotka koodaavat vastaavia AgrB- ja AgrD-proteiineja, kuin jo ennestään hyvin tunnettu *Staphylococcus aureuksen* solujen väliseen viestintään liittyvä *agr*-systeemi (Sebahia ym. 2007). *C. botulinum* –ryhmän I genomissa *agr*-lokukset sijaitsevat kromosomissa lähekkäin; *agr-1* näyttää säätelevän itiöitymistä ja *agr-2* toksiinituotantoa (Cooksley ym. 2010). Kyseisten geenien on todettu säätelevän enterotoksiinituotantoa myös *Clostridium perfringensillä* (Ohtani & Shimizu 2016, Vidal ym. 2009). *C. botulinum* –kannat, joiden kohdalla *agrD*-geeni oli tehty toimimattomaksi, tuottivat vähemmän neurotoksiinia ja niiden itiöityminen oli huomattavasti vähentynyt verrattuna tutkimuksessa käytettyihin villin tyypin kantoihin (Cooksley ym. 2010).

C. botulinum toksiinityyppejä E tuottavalla, ryhmään II kuuluvalla Beluga-kannalla, itiöitymisprosessin pääsäätelijän Spo0A:n on todettu vaikuttavan positiivisesti botuliinitoksiinin tuotantoon (Mascher ym. 2017). Tutkimuksessa *spo0A*:n inaktivaatio johti botuliinitoksiinituotannon huomattavaan vähentymiseen, ja itiöitymisen voimakkaaseen vähentymiseen tai loppumiseen verrattuna villin tyypin kontrollikantoihin (Mascher ym. 2017).

2.5 *Clostridium botulinum* itiöityminen ja sen säätely

C. botulinum –bakteerit tuottavat itiötä, joiden ominaisuudet vaihtelevat bakteeriryhmittäin (Peck & Stringer 2005). Itiötä esiintyy luonnollisesti maaperässä, sedimentissä ja lintujen, kalojen sekä nisäkkäiden ruuansulatuskanavissa. Proteolyytiset *C. botulinum* –bakteerit ovat mesofiilejä, ja tuottavat hyvin lämmönkestäviä itiöitä (Peck & Stringer 2005). Nonproteolyyttisten *C. botulinum* –bakteerien tuottamat itiöt kestävät lämpöä kohtuullisesti. Ne pystyvät germinoitumaan bakteereiksi jopa 3 °C:een lämpötilassa, minkä seurauksena bakteerit pystyvät myös jakautumaan ja tuottamaan toksinia (Peck & Stringer 2005).

Itiöityminen on yksi *C. botulinum* selviytymisen avaintekijöistä epäsuotuisissa olosuhteissa. Itiöitymisprosessi on mallinnettu hyvin jo esimerkiksi Gram-positiiviselle aerobiselle bakteerille *Bacillus subtilikselle* (Piggot & Coote 1976). Itiöitymisen vaiheet ovat kaikilla itiötä muodostavilla organismeilla hyvin samankaltaiset (Piggot & Coote 1976). Suurin osa *B. subtiliksen* itiöitymisprosessin keskeisimmistä geeneistä esiintyy myös *C. botulinum* genomissa (Sebahia ym. 2007). Yhtäläisyyksiä itiöitymisessä on useiden eri klostridien välillä, sekä *B. subtiliksen* ja *C. botulinum* välillä (Sebahia ym. 2007). *C. botulinum* kannan ATCC 3502 itiöitymisen säätely kuitenkin eroaa nykyisten tietojen mukaan jonkin verran *B. subtilikselle* tehdystä mallista (Kirk ym. 2014). *C. botulinum* ATCC 3502 -kannan itiöistä on viime aikoina löydetty itiöitymiseen liittyviä reseptoreita, jotka reagoivat saatavilla oleviin aminohappoihin (Brunt ym. 2014). Lisäksi itiöissä näyttäisi olevan itiöitymisnopeutta sääteleviä reseptoreita (Brunt ym. 2014).

Itiöitymisen pääsäätelijä on Spo0A, joka on itiöitymisprosessin kannalta välttämätön. Spo0A:n lisäksi itiöitymisen säätelyyn osallistuvat sigma-70 –perheeseen kuuluvat vaihtoehtoiset sigmatekijät SigE, SigF, SigG ja SigK (Fawcett ym. 2000, Hilbert & Piggot 2004, Sebahia ym. 2007) (kuva 3). *B. subtiliksella* itiöitymisen laukaisee ravintoaineiden vähäisyys ja sitä seuraava fosforylaation aikaansaama Spo0A:n aktivaatio (Burbulys ym. 1991). Spo0A:n fosforylaatio *B. subtiliksella* on riippuvainen useiden eri histidiinikinaasien toiminnasta (Burbulys ym. 1991).

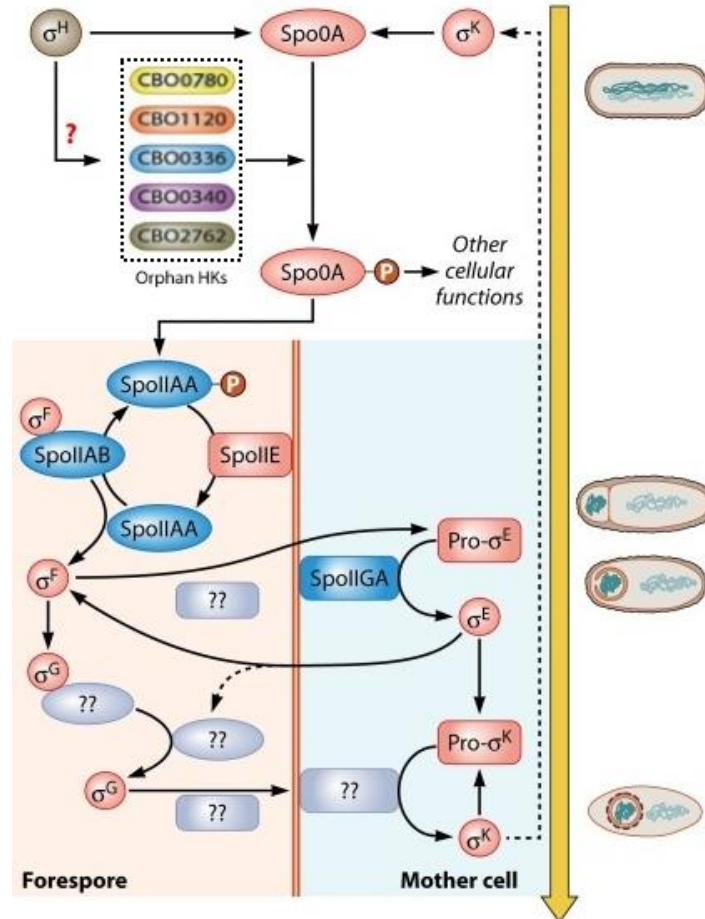
Fosforyloitu Spo0A (Spo0A~P) saa aikaan *B. subtilis*en sigmatekijäkaskadin eli itiöitymisprosessin (Hoch 1993). Aktivoitunut Spo0A~P säätelee positiivisesti *spoIIA*-operonia, joka sisältää sigmatekijää koodaavan geenin *sigF* (Kroos 2007). Lisäksi Spo0A~P säätelee positiivisesti *spoIIG*-lokusta, joka sisältää sigmatekijöitä koodaavat geenit *sigE* ja *sigG*. Kyseisten geenien aktivoituminen *B. subtilis*ella aiheuttaa negatiivisen palautteen *spo0A*-geenille, jolloin sen ilmeneminen vähenee. *C. botulinum*illa on viisi eri orpokinaasia (Orphan histidine kinases) genomissaan (CBO0336, CBO0340, CBO0780, CBO1120 ja CBO2762), joiden ajatellaan tällä hetkellä osallistuvan Spo0A:n fosforylomiseen (Sebahia ym. 2007) (kuva 3).

Solun jakautuessa itiöön ja emosoluun, *B. subtilis*en sigmatekijät SigF ja SigE aktivoituvat (Wang ym. 2006). SigF-sigmatetekijän aktivaatio johtaa *sigE*-geenin transkriptioon (Narula ym. 2012). SigG aktivoituu itiön esiasteessa emosolun nielaistessa sen sisäänsä. SigG osallistuu todennäköisesti *C. botulinum*illa itiön kuorikerroksen muodostumisen säätelyyn (Kirk ym. 2014). Itiönkuorikerroksen muodostuminen *B. subtilis*ella alkaa, kun SigK aktivoituu emosolussa SigG:n laukaisemana (Hilbert & Piggot 2004). *C. botulinum*illa geenien transkriptiojärjestys näyttäisi eroavan *B. subtilis*esta ainakin niin, että sigmatekijöiden koodaaminen alkaisikin *sigK*- ja *spo0A*-geenien luennalla eksponentiaalisen kasvun vaiheessa, minkä jälkeen vuoron perään aktivoituvat geenit *sigF*, *sigE* ja *sigG* (Kirk ym. 2014). Stationaarivaiheessa seuraa geenin *sigK* uudelleenaktivaatio (Kirk ym. 2014). Emosolun puolella rakennegeenien säätelystä vastaavat siis sigmatekijät SigE ja SigK, ja esi-itiön puolella SigF ja SigG.

*C. tetani*in tuottamalla tetanustoksiinilla (TeTx) on botuliinitoksiinin kanssa paljon yhtäläisyyksiä. Suurimmillaan geneettiset yhtäläisyydet niiden välillä ovat noin 50–65 % botuliinitoksiinityypistä riippuen (Marvaud ym. 1998). *C. tetani*illa on toksiinituotantoa positiivisesti säätelevä transkriptiotekijä TetR, jolla on myös geneettisesti paljon yhtäläisyyksiä *C. botulinum*in vaihtoehtoisen sigmatekijän BotR kanssa (Eisel ym. 1986). BotR säätelee *C. botulinum*illa toksiinigeeniklusteriin kuuluvien geenien transkriptiota (Marvaud ym. 1998).

Streptomyces coelicolor -lajilla TetR-perheeseen kuuluvan säätelytekijän SCO3201 liikatuotannon on todettu heikentävän voimakkaasti sen metaboliareittien ja itiöitymisprosessin toimintaa (Xu ym. 2010). Tutkimustuloksen perusteella herääkin

kysymys mahdollisesta *C. tetaniin* transkriptitekijän TetR ja *C. botulinumin* vaihtoehtoisen sigmatekijän BotR roolista itiöitymisprosessin säätelyssä.



Kuva 3 *C. botulinumin* itiöityminen on monivaiheinen prosessi. Itiöitymisen pääsäätelijänä toimii Spo0A, joka fosforyloituaan aktivoi edelleen sigmatekijäkaskadin. *C. botulinumilla* on viisi eri orpokinaasia genomissaan (CBO0336, CBO0340, CBO0780, CBO1120 ja CBO2762), joiden ajatellaan tällä hetkellä osallistuvan Spo0A:n fosforylomiseen. Sigmatekijäkaskadiin kuuluvat sigmatekijät SigE ja SigK, jotka vastaavat itiön rakennegeenien säätelystä emosolun puolella, ja SigF ja SigG esi-itiön puolella. Kuva muokattu, lähde: Al-Hinai ym. 2015.

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tutkimus koostui kahdesta erillisestä osasta. Osa I on tutkimuksen metodologinen osio, jonka tarkoituksena oli selvittää mahdollista korrelaatiota bakteerisolumäärän ja niistä saatavan RNA-määrän välillä. Tutkimuksessa käytettiin *C. botulinum* ATCC 3502 -kannan populaatioita, jotka sisälsivät 10^4 – 10^6 bakteerisolua/ml. Saatujen tulosten perusteella arvioitiin optimaalinen bakteerisolumäärä, joka tarvitaan RNA-sekvensointiin ja RT-qPCR –menetelmään.

Osa II on tutkimuksen biologinen osio, jonka tarkoituksena oli vertailla kahden eri *C. botulinum* ATCC 3502 -kannan isolaatin transkriptioprofiilia valittujen toksiinituotantoon ja itiöitymiseen liittyvien kohdegeenien (*botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigF*, *sigE*, *sigG* ja *CBO1443*) osalta. Aikaisempien tulosten perusteella tiedettiin myös, että tutkimuksessa käytettävien isolaattien neurotoksiinituotantokyky ja itiöitymiskyky eroavat toisistaan. Tutkimuksessa käytettävistä isolaateista *tox*⁺-isolaatti tuottaa botuliinitoksiinia, kun taas laboratorio-olosuhteissa spontaanisti mutatoitunut isolaatti *tox*⁻ tuottaa botuliinitoksiinia huomattavasti vähemmän.

Myös itiöitymisen osalta alustavat tutkimustulokset viittasivat siihen, että *tox*⁻-isolaatin kyky itiöityä oli heikentynyt (ei aineistoa saatavilla). *Tox*⁺- ja *tox*⁻-isolaateille tehty genomianalyysi toi esiin tärkeitä eroavaisuuksia isolaattien genotyyppien ja fenotyyppien suhteen. *Tox*⁻-isolaatin vaihtoehtoisesta sigmatekijästä BotR on genomianalyysin perusteella löydetty geenin lukukehyksen muuttava insertiomutaatio.

Tutkimus antaa tärkeää lisätietoa *C. botulinum* itiöitymisen ja toksiinituotannon säätelystä saman kannan eri tavoin käyttäytyvillä solupopulaatioilla. Hypoteesina tutkimuksen osalle II oli, että ATCC 3502 –isolaattien (*tox*⁺ ja *tox*⁻) transkriptioanalyysit eroavat toisistaan toksiinituotantoon ja itiöitymiseen liittyvien geenien osalta. *Tox*⁺-isolaatin odotettiin ilmentävän geenejä enemmän kuin isolaatin *tox*⁻.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Aineisto

4.1.1 Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat

Tutkimuksessa käytetty *C. botulinum* ATCC 3502 -kanta on eristetty Yhdysvaltojen lounaisosasta 1920-luvulla (henkilökohtainen tiedonanto, prof. Mike Peck). Kannan maaperästä eristi Ivan C. Hall (henkilökohtainen tiedonanto, prof. Mike Peck). Hän tutki 1920- ja 1930-luvuilla Yhdysvaltojen länsiosassa botulisman aiheuttamia taudinpurkauksia, ja eristi useita *Clostridium*-näytteitä maaperästä (henkilökohtainen tiedonanto, prof. Mike Peck).

ATCC 3502 -kanta kuuluu ryhmän I proteolyyttisiin bakteereihin. Kanta tuottaa tyypin A-toksiinia, ja näin ollen sitä kutsutaankin usein Hall A -kannaksi. Laboratorioolosuhteissa ATCC 3502 -kanta on spontaanisti mutatoitunut, minkä seurauksena siitä on kehittynyt solupopulaatio (*tox*⁻), joka tuottaa botuliinitoksiinia huomattavasti vähemmän kuin alkuperäinen solupopulaatio (*tox*⁺). *Tox*⁻-isolaatin perimästä on löydetty mutaatio sigmatekijästä BotR aikaisemman genomianalyysin perusteella (taulukko 1). Genomianalyysin tulosten perusteella toksiinituotantoon liittyen tutkimukseen valikoitui muiden tutkittavien geenien ohelle (*botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigF*, *sigE* ja *sigG*) eritettävää proteaasia koodaava kohdegeeni *CBO1443* (taulukko 1).

Taulukko 1 Genomianalyysin perusteella *tox*-isolaatin genomista löydettiin mutaatio vaihtoehtoisesta sigmatekijästä BotR. Geenistä *botR* löytynyt insertiomutaatio muuttaa geenin lukukehyksen. Eritettävää proteaasia koodaavassa geenissä *CBO1443* on kaksi emäksen muuttavaa pistemutaatiota. Se valikoitui kiinnostavana geeninä mukaan tutkimukseen.

Geeni/ Lokus	Alkuperäinen nukleotidi- järjestys	Uusi nukleotidi- järjestys	Geenin tehtävä	Mutaatio
CBO0804	G	GA	Koodaa vaihtoehtoisia sigmatekijää BotR	Lukukehyksen muuttava insertiomutaatio
CBO1443	G	K	Koodaa eritettävää proteaasia	Aminohapon ja emäksen muuttava pistemutaatio
CBO1443	G	R	Koodaa eritettävää proteaasia	Aminohapon ja emäksen muuttava pistemutaatio

Tutkimuksessa käytetään myös alustavana vertailukohteena ATCC 3502 –kannan *Clostron*-menetelmällä mutatoitua isolaattia, jolta on tehty toimimattomaksi vaihtoehtoisia sigmatekijää BotR koodaava geeni *botR*.

4.1.2 Bakteerien kasvatusta ja kasvuolosuhteet

Tox⁺-isolaatin bakteerit kasvatettiin itiönäytteestä, jota oli säilytetty 4 °C:ssa. *Tox*⁻-isolaatin kasvattamiseen käytettiin -70 °C:ssa säilytettyä vegetatiivisolunäytettä. Bakteereita kasvatettiin 37 °C:ssa anaerobikaapissa (kaasukoostumus 85% N₂, 15% CO₀, 5% H₂). Kasvatusliemenä käytettiin tryptoni-peptoni-glukoosi-hiivauutetta (TPGY).

Bakteeriliuosta siirrostettiin molemmista kasvatetuista isolaateista 24 tunnin kuluttua kasvatuksen aloittamisesta uusiin koeputkiin TPGY-liemeen. Siirrostaminen toistettiin 24 tunnin kuluttua, jotta bakteerisolupopulaatioista saataisiin mahdollisimman tasalaatuisia solusyklin suhteen. Tämän jälkeen molempien kantojen kasvatusliuosten optista tiheyttä (OD 600 nm) mitattiin tunnin välein, jotta niille saatiin muodostettua kasvukäyrät, joita pystyttiin vertaamaan toisiinsa.

4.2 Menetelmät

4.2.1 Bakteerisolujen kerääminen

RNA-eristystä varten sekä *tox*⁺-isolaatista että *tox*⁻-isolaatista eristettiin bakteerisolupopulaatioiden eri kasvuvaiheista (4 h, 6 h, 8 h, 10 h ja 20 h) kolmen näytteen tekninen toistosarja (kuvaaja 2). Näytteet kerättiin steriileihin koeputkiin, jotka sisälsivät jäämurskassa viilennettyä etanoli-fenoli –pysäytysliuosta (9:1) (Sigma-Aldrich, MO, Yhdysvallat). Solunäytteet pipetoitiin koeputkiin pysäytysliuoksen kanssa suhteessa 5:1.

Perusteellisen sekoittamisen jälkeen koeputkia inkuboitiin 30 minuutin ajan jäämurskassa. Bakteerisolut kerättiin sentrifugoimalla koeputkia 5 minuutin ajan (4 °C, 5000 rpm). Solupelletit säilytettiin -70 °C:ssa.

4.2.2 RNA:n eristäminen

RNA eristettiin käyttämällä RNeasy minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Saksa) -sarjaa. Solupellettejä sulatettiin huoneenlämmössä 5 minuutin ajan ennen RNA-eristuksen aloittamista. Solut hajotettiin entsymaattisesti 25 mg/ml lysotsyymiä (Sigma-Aldrich, MO, Yhdysvallat) ja 250 IU/ml mutanolysiiniä (Sigma-Aldrich) sisältävällä liuoksella.

Puskurina hajotusreaktiossa toimi Tris-EDTA –puskuriliuos (pH 8.0; Fluka BioChemica, Buchs, Sveitsi). Koeputkia inkuboitiin 37 °C:een lämpötilassa 30 minuutin ajan solujen entsymaattisen hajoamisen kiihdyttämiseksi. Solujen hajottamisen jälkeen RNA:n

eristäminen suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Eristetty RNA säilytettiin pakastimessa lämpötilassa -70 °C.

4.2.3 RNA-konsentraation mittaaminen ja eheyden tarkastaminen

Eristetyn RNA:n konsentraatiota ja puhtautta (A_{260}/A_{280}) mitattiin NanoDrop ND-1000 -spektrofotometrin (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, Yhdysvallat) avulla. Kaikkien tutkimuksessa käytettyjen RNA-näytteiden A_{260}/A_{280} -arvo oli >2.0. Näytteiden RNA-eheys varmistettiin Agilent RNA Nano2000 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., CA, Yhdysvallat) -pienoiskokoisen geelielektroforeesin avulla.

4.2.4 DNAasi-käsittely

RNA-näytteille suoritettiin DNAasi-käsittely, jotta hajotettujen solujen kaikki genominen DNA saatiin poistettua tehokkaasti. DNAasi-käsittelyyn käytettiin DNA-free kit (Ambion, TX, Yhdysvallat) -sarjaa valmistajan ohjeiden mukaisesti.

DNAasi-käsittelyn jälkeen näytteiden RNA-konsentraatiot mitattiin NanoDrop ND-1000 -spektrofotometrin avulla uudelleen. Näin ollen voitiin varmistua, että näytteiden RNA-konsentraatiot eivät olleet muuttuneet käsittelyn aikana merkittävästi.

4.2.5 cDNA-synteesi RNA:sta

cDNA-synteesiin jokaisesta RNA-näytteestä otettiin RNA:ta 500 ng. cDNA:n valmistamiseen käytettiin Maxima cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) -sarjaa valmistajan ohjeiden mukaisesti. Kokonaistilavuus koeputkissa kaikilla näytteillä oli 20 µl. DNA-synteesille suoritettiin myös kontrollireaktiot mahdollisen DNA-kontaminaation poissulkemiseksi ja alukkeiden toimimisen varmistamiseksi.

Lopulliset liuokset sisälsivät 15 ng/µl satunnaisia alukkeita, 10 IU käänteiskopioijaentsyymiliuosta (M-MuLV RNAasi H+) (Thermo Fisher Scientific), ja puskuriliuosta, joka sisälsi nukleotideja ja $MgCl_2$: ia 5mM (1 x, Thermo Fisher Scientific) lopullisesta konsentraatiosta. Koeputkia inkuboitiin 25 °C:ssa 10 minuutin ajan, 50 °C:ssa

15 minuutin ajan, ja inaktivoitiin 80 °C:ssa 5 minuutin ajan. Lopuksi näytteet jäähdytettiin 4 °C:n lämpötilaan, minkä jälkeen ne säilytettiin -20 °C:n lämpötilassa.

4.2.6 RT-qPCR

RT-qPCR eli kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio suoritettiin valituille kohdegeeneille (*botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigF*, *sigE*, *sigG* ja *CBO1443*) isolaattien *tox*⁺ ja *tox*⁻ välillä transkriptiotasolla esiintyvien erojen löytämiseksi. Reaktioon käytettiin DyNAmo Flash SYBR green qPCR kit (Thermo Fisher Scientific) -sarjaa. Jokaiselle näytteelle tehtiin kolme rinnakkaista reaktiota.

Jokainen reaktioputki sisälsi 1 x DyNAmo Flash SYBR green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) -reagenssia, 0,5 µM juostetta eteenpäin syntetisoivaa forward-aluketta ja saman verran juostetta taaksepäin syntetisoivaa reverse-aluketta. Lopuksi lisättiin 4 µl cDNA-liuosta, jonka laimennossuhde oli 1:10⁴ (*16S rRNA*) tai 1:10² (*botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigE*, *sigF*, *sigG* ja *CBO1443*). Kokonaistilavuus kaikissa reaktioputkissa oli 25 µl.

qPCR-reaktiot suoritettiin Rotor-Gene RG3000 thermal cycler (Qiagen) -laitteella. Ohjelman alussa näytteitä inkuboidaan 95 °C –lämpötilassa 10 minuutin ajan DNA-polymeraasin aktivoimiseksi. Inkuboinnin jälkeen laite suorittaa 45 denaturaatiosykliä; joissa lämpötila nousee 95 °C:een 15 sekunnin ajaksi, ja sen jälkeen tapahtuu 60 sekuntia kestävä alukkeiden liittymisvaihe ja pidentymisvaihe 60 °C –lämpötilassa. Aineiston kerääminen suoritettiin denaturaatiosyklin pidentymisvaiheen aikana.

cDNA:sta valmistettujen laimennossarjojen (1:10² – 1:10⁶) avulla jokaiselle alukeparille saatiin standardikäyrät, ja reaktioiden amplifikaatioiden hyötysuhteet määritettiin niistä saadun aineiston avulla. Rotor-Gene 6 (Qiagen) -sovelluksen avulla jokaisen alukeparin fluoresenssille määritettiin kynnystaso, jonka avulla reaktioiden hyötysuhteet pystyttiin laskemaan. Alukkeiden reaktiohyötysuhteet vaihtelivat välillä 0.87–1.17.

Laimennossuhdetta 1:10² käytettiin tutkittavista näytteistä alukepareille *botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigE*, *sigF*, *sigG* ja *CBO1443*. Referenssigeeninä käytettiin nk. ”housekeeping”-geeniä *16S rRNA*, jonka alukeparille käytettiin laimennossuhdetta 1:10⁴. Jokaisessa qPCR-ajossa kontrollina oli mukana kolme cDNA:ta sisältämätöntä reaktioputkea

jokaiselta alukeparilta, jotta voitiin varmistua, ettei reagenssi ollut kontaminoitunut. Lisäksi jokaisen qPCR-ajon sulamispisteet tarkastettiin alukespesifisyyden takaamiseksi.

Kohdegeenien ilmentäminen mutatoituneella isolaatilla (*tox*⁻) määritettiin normalisoimalla saadut tulokset vertaamalla niitä lähdegeeniin (*16S rRNA*), ja kalibroimalla vastaaviin *tox*⁺-isolaatin tuloksiin. Haluttujen geenien esiintymisen laskemiseen käytettiin Pfaffl-menetelmää (Pfaffl 2001), jossa jokaisen alukeparin kohdegeenien ilmenemisen suhdeluvut lasketaan reaktion hyötysuhde huomioon ottaen. Saaduille isolaattien suhdeluvuille laskettiin varianssianalyysin (ANOVA) avulla P-arvot.

5 TULOKSET

5.1 Bakterisolujen ja niistä eristetyn RNA-määrän suhde

5.1.1 RNA:n konsentraatio ja puhtaus

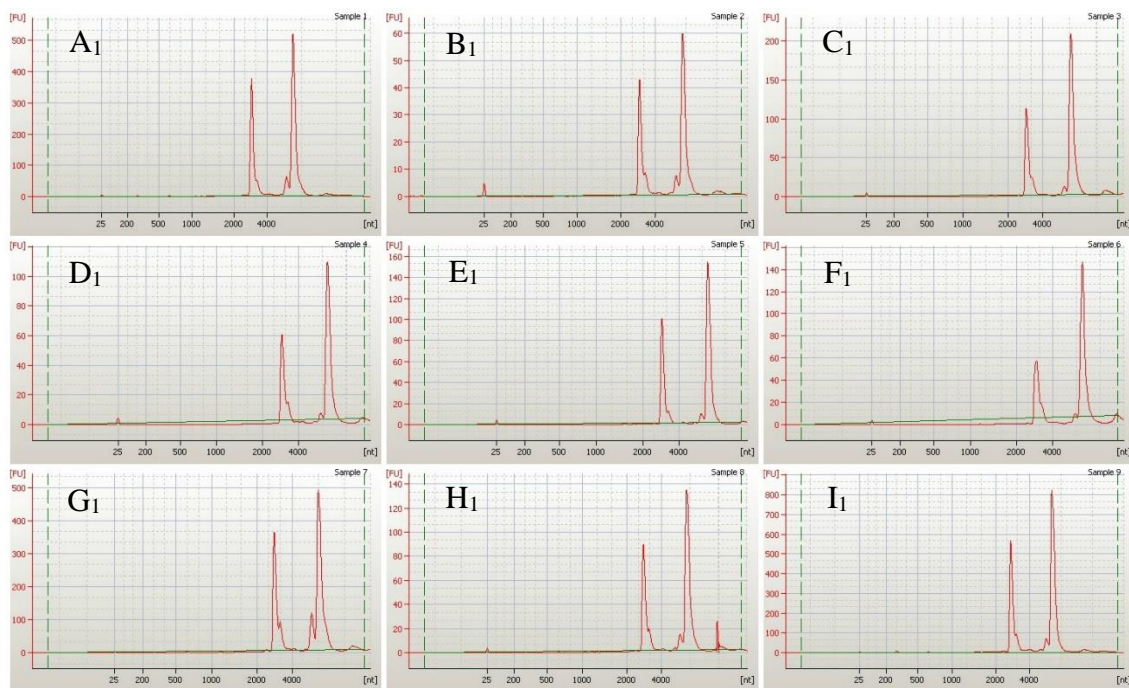
NanoDrop ND-1000 -spektrofotometria käytettiin bakterisoluista eristetyn RNA:n konsentraation mittaamiseen ja RNA:n puhtauden (A_{260}/A_{280}) määrittämiseen. Kaikkien tutkimukseen käytettyjen näytteiden A_{260}/A_{280} -arvo oli >2,0 (taulukko 2).

Taulukko 2 Tutkimuksen osassa I käytettyjen bakteerisolupopulaatioiden solumäärä ja niistä eristettyjen RNA-näytteiden spektrofotometrillä mitatut konsentraatiot, sekä RNA:n puhtaudesta kertovat A_{260}/A_{280} –arvot.

Näyte	Solumäärä	RNA-konsentraatio (ng/μl)	A_{260}/A_{280}
1	950000	70,1	2,36
2	1120000	130,6	2,23
3	1120000	146,3	2,26
4	1150000	120,9	2,20
5	1590000	115,6	2,21
6	1620000	189,4	2,22
7	2150000	427,3	2,19
8	2170000	521,3	2,17
9	2980000	617,7	2,17

5.1.2 RNA:n eheys

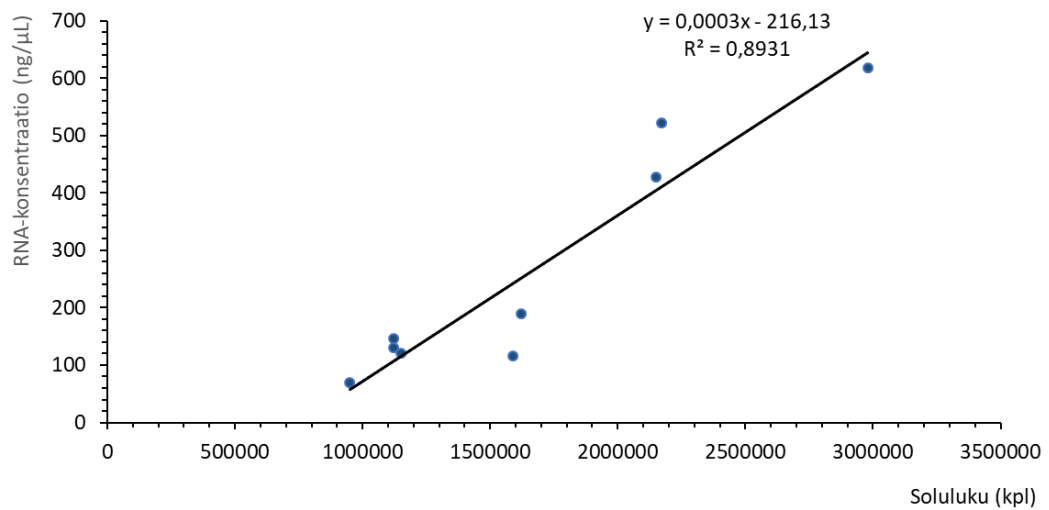
Kaikkien tutkimuksessa käytettävien RNA-näytteiden eheys tarkastettiin Bioanalyzer-laitteen avulla. RNA-näytteiden kuvaajat olivat yhteneväisiä ja muodostivat kaksi selkeää fluoresenssiipiikkiä, toisen *16S rRNA*:lle ja toisen *23S rRNA*:lle (kuva 4).



Kuva 4 RNA-näytteiden eheys. Tutkimuksen osassa I käytettyjen RNA-näytteiden (A₁-I₁) eheydestä kertovat Bioanalyzer-geelelektroforeesilla saadut tulokset. Näytteiden kuvaajat olivat yhteneväiset ja muodostivat kaksi selkeää fluoresenssipeikkiä, toisen *16S rRNA*:lle ja toisen *23S rRNA*:lle. X-akselilla molekyylikoko (nt), ja y-akselilla fluoresenssi (FU).

5.1.3 Solumäärän ja RNA:n välinen korrelaatio

C. botulinum ATCC 3502 -kannan pienten $10^4 - 10^6$ bakteerisolua sisältävien bakteerisolupopulaatioiden perusteella havaittiin korrelaatio solulukumäärän ja RNA-konsentraation välille laskennallisesti NanoDrop-menetelmän avulla. Korrelaatio kuvaa muuttujien, eli solulukumäärän ja RNA-konsentraation, välistä riippuvuutta. Jos muuttujien välillä on täydellinen riippuvuus, korrelaatiokerroin saa arvon 1. Bakteerisolulukumäärän ja saadun RNA-konsentraation välinen korrelaatiokerroin $R^2=0,89$. Tämä kertoo, että muuttujien välillä on selkeä korrelaatio, mutta se ei ole täydellinen. Laskennallisesti saatujen pisteiden perusteella oli mahdollista muodostaa korrelaatiokuvaaja (kuvaaja 1). Korrelaatiokuvaajaa ei ole mahdollista ekstrapoloida kuvaajan ulkopuolelle.



Kuvaaja 1 Bakterisolupopulaation koon (soluluku, kpl) vaikutus eristety RNA:n konsentraatioon (ng/μl).

Korrelaatiokuvaajan standardisuoran kulmakertoimen eli korrelaatiokertoimen ($R^2=0,89$) perusteella oli mahdollista laskea tarvittava bakteerisolulukumäärä valituille RNA-menetelmille, eli RT-qPCR:lle ja RNA-sekvensoinnille (taulukko 3). Suomen molekyyli lääketieteen instituutti (FIMM) tarjoaa RNA-sekvensointipalveluita eri RNA-määriille. Käytettävästä RNA-määrästä riippuen sekvensoinnissa käytetään eri sarjaa. Optimaalinen RNA-määrä RNA-sekvensointiin on 5000 ng.

Taulukko 3 Bakteerisoluluvun ja RNA-konsentraation välille muodostetun standardisuoran kulmakertoimen avulla voitiin laskea tarvittava solulukumäärä RT-qPCR- ja RNA-sekvensointi –menetelmille.

Menetelmä	Tarvittava RNA-massa (ng)	Tarvittava solumäärä (kpl)
RT-qPCR	500 ng	$8,0 \cdot 10^5$
RNA-sekvensointi (hyvin vähäinen määrä)	1000 ng	$8,4 \cdot 10^5$
RNA-sekvensointi (vähäinen määrä)	3000 ng	$1,0 \cdot 10^6$
RNA-sekvensointi (optimaalinen määrä)	5000 ng	$1,2 \cdot 10^6$

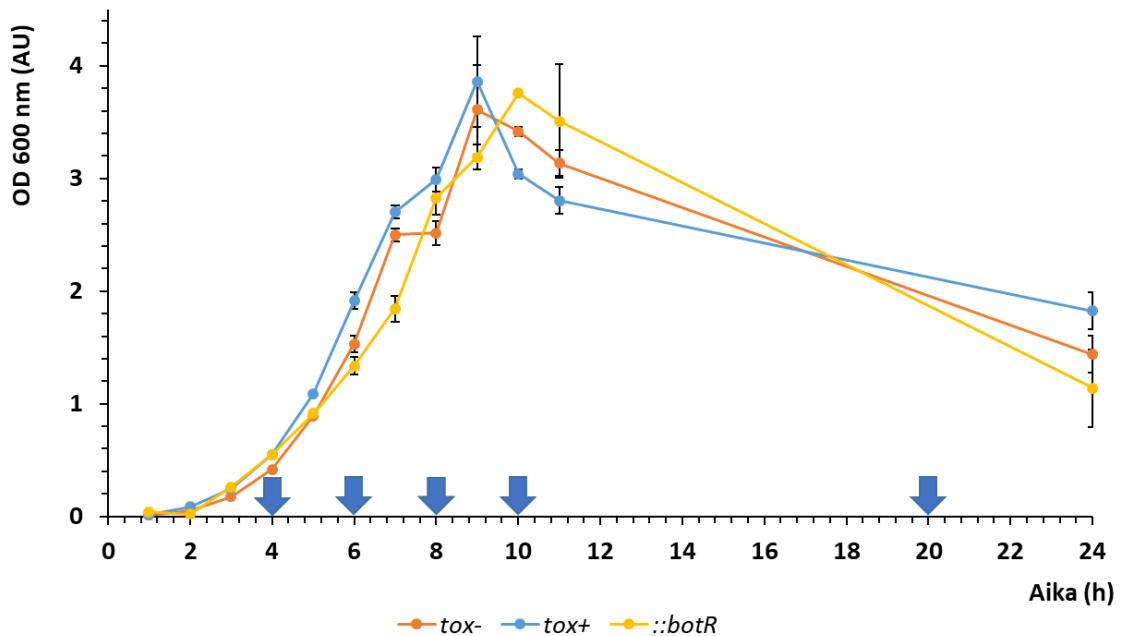
5.2 ATCC 3502 –kannan isolaattien transkriptioprofiilien vertailu

5.2.1 Kasvukäyrät

C. botulinum –isolaattien kasvukäyrät voidaan jakaa kolmeen eri vaiheeseen, joita ovat lag-vaihe eli viivevaihe, eksponentiaalisen kasvun vaihe ja stationäärivaihe (Baranyi ym. 1993). Lag-vaihe eli niin sanottu viivevaihe edeltää solupopulaation eksponentiaalisen kasvun vaihetta. Eksponentiaalisen kasvun vaiheessa bakteereiden kasvu on logaritmista, eli nopeasti moninkertaistuvaa (Baranyi ym. 1993). Eksponentiaalisen kasvun vaihetta seuraa stationäärivaihe, kun elintilasta tai jostakin solupopulaation käytössä olevasta ravinteesta tulee puute, ja näin ollen populaation kasvu loppuu ja solut alkavat kuolla. Itiöityminen on solujen tapa selviytyä niille epäsuotuisista olosuhteista, joten kun resursseista alkaa olla pulaa, bakteerit alkavat muodostaa lepomuotoja eli itiöitä.

Eri bakteerisolupopulaatioiden kasvukäyrien muodot eivät eroa merkittävästi toisistaan (kuvaaja 2). Tämän perusteella voitiin päätellä, etteivät *tox*-isolaatin genomista löytyneet

mutaatiot, eikä *::botR*-isolaatin genotyyppi (*botR*-geenin Clostron-mutaatio) ole vaikuttaneet merkittävästi solupopulaatioiden kasvukykyyn.

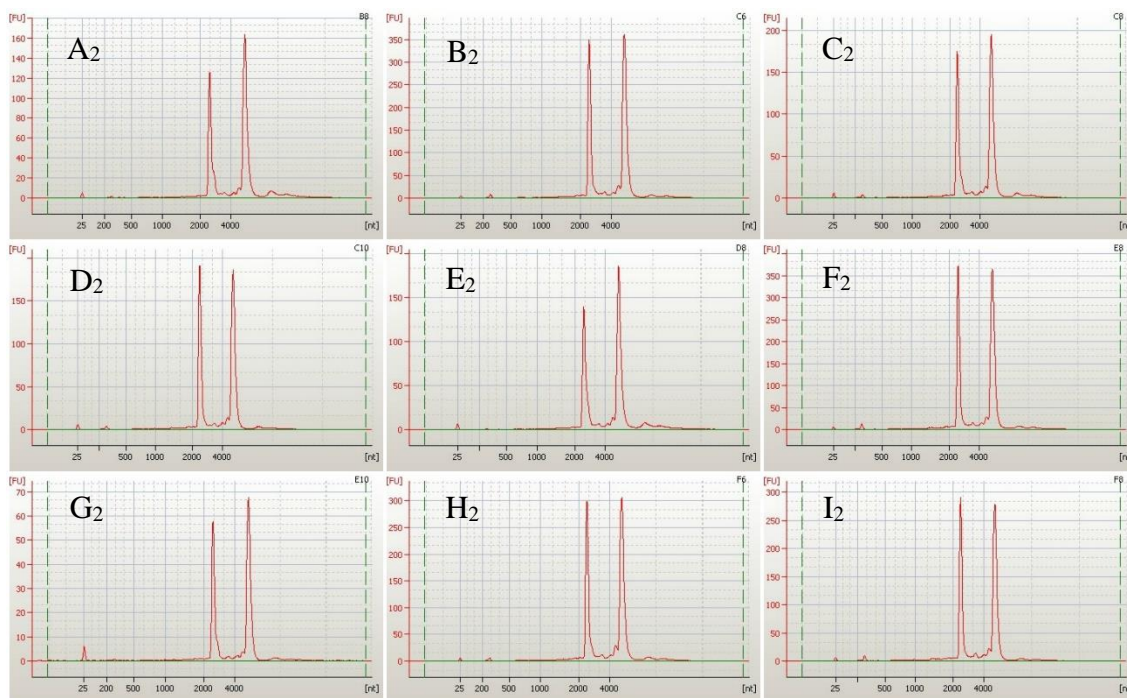


Kuvaaja 2 Isolaatin *tox+* kasvukäyrä näkyy kuvaajassa sinisellä, isolaatin *tox-* kasvukäyrä oranssilla ja Clostron-mutatoidun kannan (*::botR*) kasvukäyrä keltaisella. Kasvukäyristä voidaan havaita viivevaihe noin ajanhetkellä 0–3 h ja eksponentiaalisen kasvun vaihe alkaen noin ajanhetkestä 3 h eteenpäin. Eksponentiaalisen kasvun loppuvaihe ajoittuu solupopulaatiosta riippuen aikavälille 8–10 h, minkä jälkeen aikaa stationäärivaihe. Bakteerisolupopulaatiot kasvatettiin anaerobisissa olosuhteissa 37 °C:een lämpötilassa TPGY-kasvatusliemessä. Bakteerit eristettiin bakteerikasvustoista nuolten osoittamalla ajanhetkillä RNA:n eristämistä ja transkriptioanalyysiä varten. Solunäytteiden optinen tiheys (OD) tutkittiin valonpituudella 600 nm.

5.2.2 RNA:n konsentraatio, puhtaus ja eheys

NanoDrop ND-1000 -spektrofotometria käytettiin bakteerisoluista eristetyn RNA:n konsentraation mittaamiseen ja RNA:n puhtauden (A_{260}/A_{280}) määrittämiseen. Kaikkien tutkimuksessa käytettyjen näytteiden A_{260}/A_{280} -arvo oli >2.0 , joten näytteiden laatu oli hyvä.

Bioanalyzer-laitteen avulla kaikkien tutkimuksessa käytettävien RNA-näytteiden eheys tarkastettiin. RNA-näytteiden kuvaajat olivat yhteneväisiä ja muodostivat kaksi selkeää fluoresenssipiikkiä, toisen *16S rRNA*:lle ja toisen *23S rRNA*:lle (kuva 5).

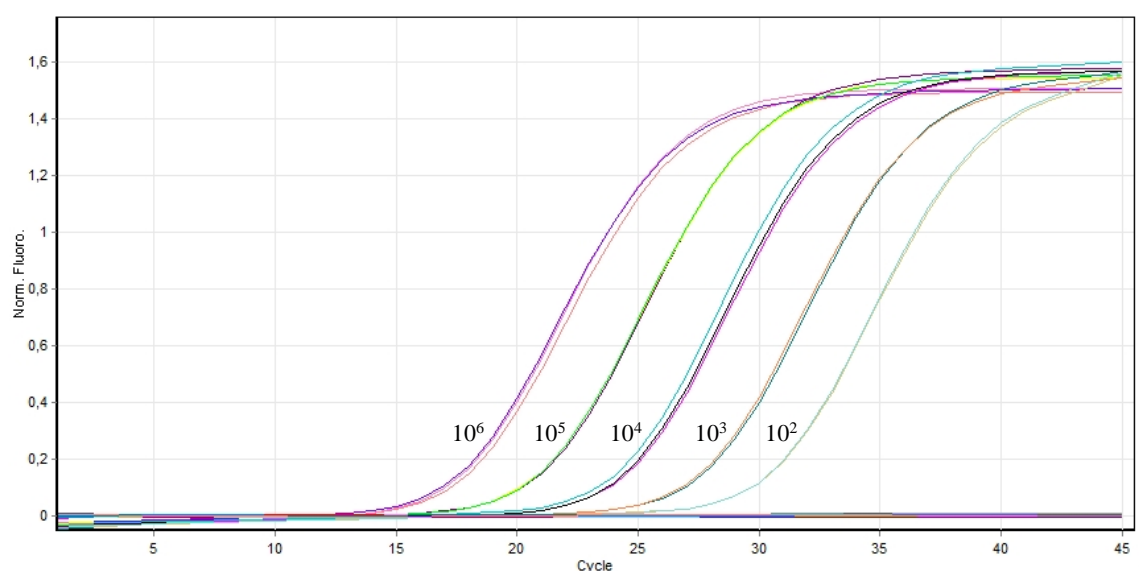


Kuva 5 RNA-näytteiden eheys. Bioanalyzer-pienoiselektroforeesilla saatuja esimerkkituloksia tutkimuksen osassa II käytettävien RNA-näytteiden (A₂-I₂) eheydestä. Näytteiden kuvaajat olivat yhteneväiset ja muodostivat kaksi selkeää fluoresenssipiikkiä, toisen *16S rRNA*:lle ja toisen *23S rRNA*:lle. X-akselilla molekyylikoko (nt), ja y-akselilla fluoresenssi (FU). Kaikkien tutkimuksessa käytettävien RNA-näytteiden tulokset olivat yhtäläisiä esimerkkikuvien kanssa.

5.2.3 Standardikäyrät ja sulamispisteet

Jokaiselle tutkimuksessa käytetylle alukeparille (*botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigE*, *sigF*, *sigG*, *16S rRNA*, *CBO1443*) valmistettiin cDNA:sta laimennossarjat ($1:10^2$ – $1:10^6$).

Laimennossarjojen avulla jokaiselle alukeparille saatiin RT-qPCR –ajosta standardikäyrät (kuvaaja 3). Standardikäyrien perusteella oli mahdollista määrittää reaktioiden amplifikaatioiden hyötysuhteet (taulukko 4).

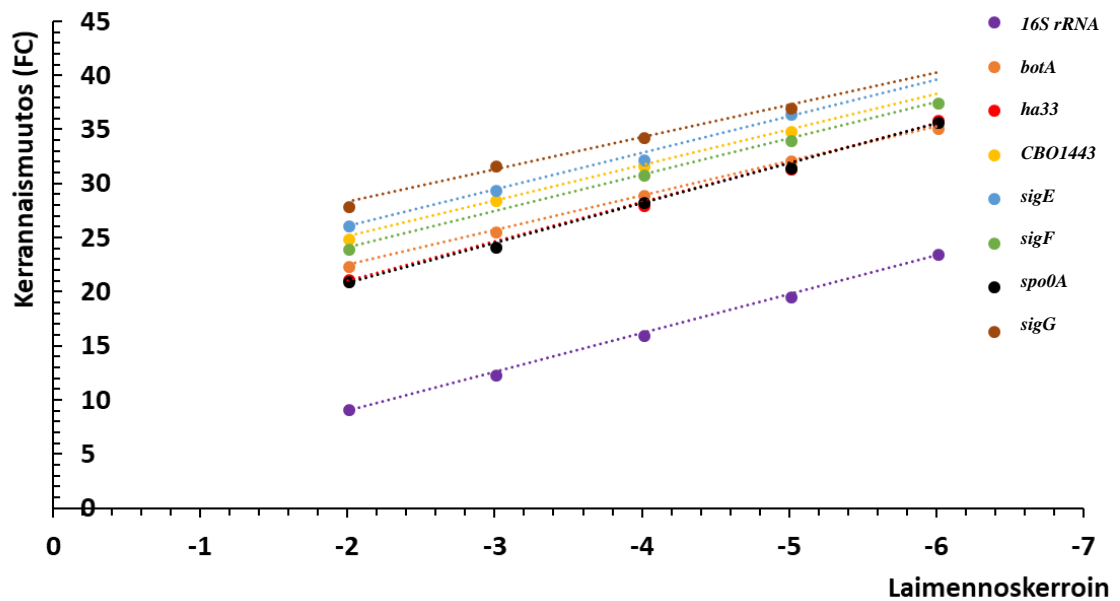


Kuvaaja 3 Geenin *botA* standardikäyrät. cDNA:sta valmistettujen laimennossarjojen ($1:10^2$ – $1:10^6$) avulla jokaiselle alukeparille saatiin RT-qPCR –ajosta standardikäyrät, joiden avulla määritettiin reaktioiden amplifikaatioiden hyötysuhteet. X-akselilla aika (s), ja y-akselilla fluoresenssi (F).

Kaikille tutkimuksen kohdegeeneille (*botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigE*, *sigF*, *sigG*, *16S rRNA*, *CBO1443*) muodostettiin standardisuorat laimennossarjojen $1:10^2$ – $1:10^6$ avulla.

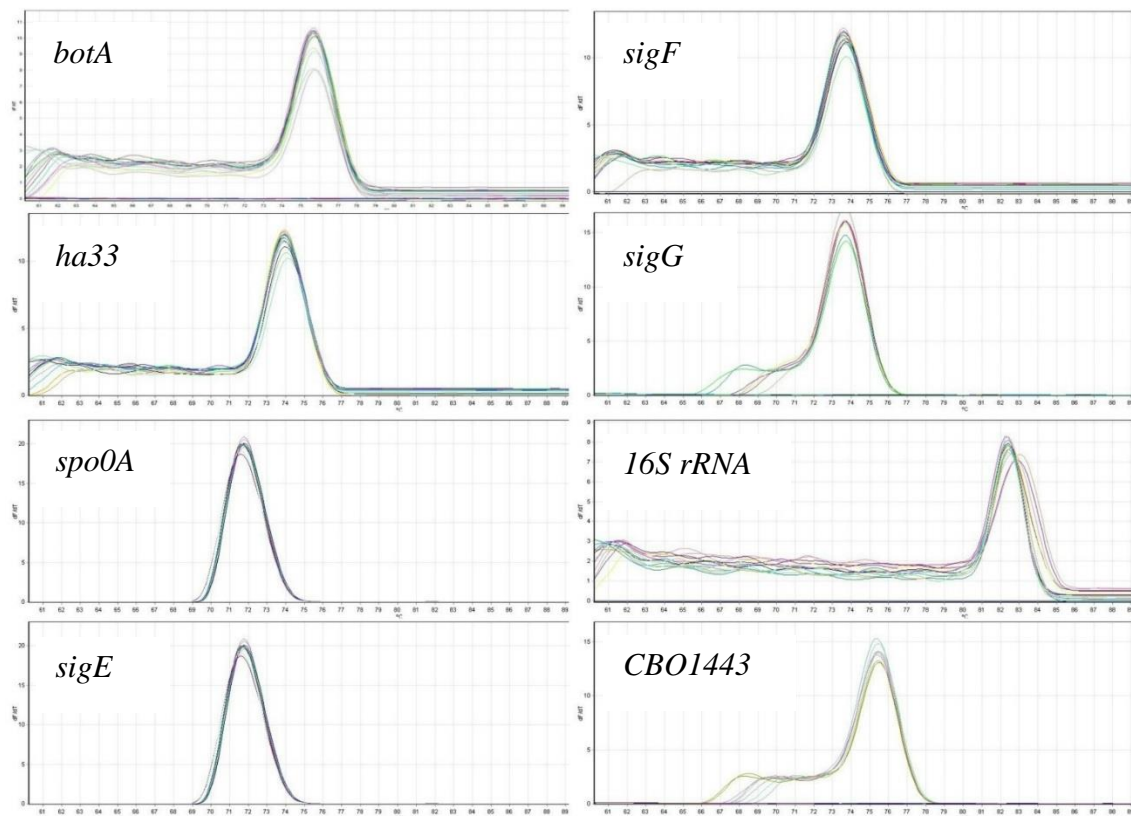
Jokaisen kohdegeenin standardisuoran pisteet asettuivat lähes lineaarisesti toisiinsa nähden, ja suorat olivat myös keskenään lähes yhdensuuntaiset (kuvaaja 4).

Standardisuoran kulmakertoimen avulla on mahdollista määrittää jokaiselle alukeparille niiden RT-qPCR –reaktioiden hyötysuhteet.



Kuvaaja 4 Standardisuorat kaikille tutkimuksen kohdegeeneille (*botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigE*, *sigF*, *sigG*, *16S rRNA*, *CBO1443*) laimennossarjoilla $1:10^2$ – $1:10^6$. Kuvasta voidaan havaita, että jokaisen geenin suoran pisteet asettuvat lähes lineaarisesti toisiinsa nähden, ja suorat ovat keskenään lähes yhdensuuntaiset. Standardisuurien kulmakertoimien avulla voitiin määrittää jokaisen alukeparin RT-qPCR –reaktiolle hyötysuhde.

Jokaisen RT-qPCR –ajon sulamispisteet tarkastettiin reaktiospesifisyyden ja alukespesifisyyden takaamiseksi (kuva 6). Kohdegeenin sulamispiste kertoo kyseiselle DNA:lle ominaisen denaturoitumislämpötilan. Jos ajo on reaktio- ja alukespesifinen, kuuluisi sulamispistekäyristä muodostua yksi selkeä piikki, joka kertoo DNA:n denaturoitumisvaiheen.



Kuva 6 RT-qPCR –ajojen geenikohtaiset sulamispistekuvaajat. Jokaisen qPCR –ajon sulamispisteet, eli DNA:n denaturoitumislämpötilat, tarkastettiin alue- ja reaktiospesifisyyden takaamiseksi kaikille geeneille (*botA*, *ha33*, *spo0A*, *sigE*, *sigF*, *sigG*, *16S rRNA*, *CBO1443*). Kuvassa esimerkkinä sulamispistekuvaaja jokaisen geenin yhdestä ajosta. X-akselilla aika (s), ja y-akselilla fluoresenssin muutos suhteessa lämpötilan muutokseen (dF/dT).

5.2.4 qPCR-alueparien hyötysuhde

Jokaiselle tutkimuksessa käytetylle alueparille (*16S rRNA*, *botA*, *ha33*, *CBO1443*, *spo0A*, *sigE*, *sigF*, *sigG*) määritettiin standardikäyrien kulmakertoimien perusteella RT-qPCR –reaktioiden hyötysuhde. Reaktioiden hyötysuhteet vaihtelivat välillä 0,87–1,17 (taulukko 4). Tavoiteltu reaktion hyötysuhde on 1,00, ja se toteutuu, kun haluttu sekvenssi tuplaantuu kerran ohjelman jokaisessa denaturaatiosykliä. Matalampien hyötysuhteiden syynä voivat olla esimerkiksi alukkeiden DNA-pariutumisen ja DNA:n monistumisen epätäydellisyydet sekä konsentraatioon vaikuttavat pipetointivirheet tai virheelliset reaktio-olosuhteet. Reaktion hyötysuhde voi olla myös yli 1,00 siinä tapauksessa, että reaktio on kontaminoitunut polymeraasientsyymien inhibiittoreilla, esimerkiksi DNA:lla. Reaktioiden korrelaatiokertoimet (R^2) vaihtelivat välillä 0,9921–0,9999 (taulukko 4).

Taulukko 4 Jokaiselle alukeparille määritettiin standardikäyrien perusteella laskennallisesti RT-qPCR –reaktioiden hyötysuhteet. Reaktioiden hyötysuhteet vaihtelivat välillä 0,87–1,17. Lisäksi taulukosta nähdään jokaisen alukeparin standardisuoran R²-korrelaatiokerroin. Korrelaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0,9921–0,9999.

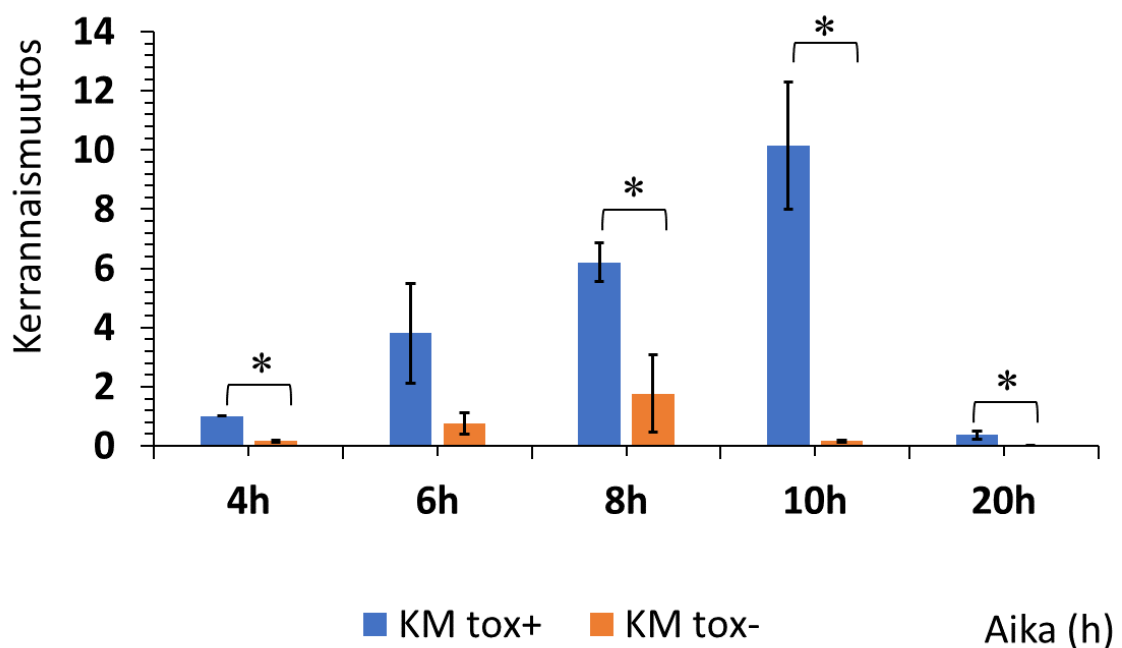
Geeni	Hyötysuhde/qPCR	Korrelaatiokerroin/R ²
<i>16S rRNA</i>	90,3 %	0,9986
<i>botA</i>	104,1 %	0,9996
<i>ha33</i>	88,1 %	0,9964
<i>CBO1443</i>	101,1 %	0,9988
<i>spo0A</i>	87,2 %	0,9976
<i>sigE</i>	97,7 %	0,9929
<i>sigF</i>	98,5 %	0,9999
<i>sigG</i>	116,7 %	0,9921

5.2.5 Geenien ilmenemisen kerrannaismuutokset

Pfaffl-menetelmän (Pfaffl 2001) avulla laskettiin jokaisen tutkitun geenin esiintyminen *tox*⁺-isolaatilla ja mutatoituneella isolaatilla *tox*⁻. Menetelmässä geenien ilmenemisen laskemiseen yhdistetään jokaisen alukeparin reaktion hyötysuhde. Laskennallisesti muodostettujen kerrannaismuutosten (KM) avulla nähtiin, kuinka geenin ilmeneminen eroaa isolaateilla toisistaan jokaisella mitatulla ajanhetkellä (4 h, 6 h, 8 h, 10 h ja 20 h).

Botuliinin rakennegeenien (*botA* ja *ha33*) ilmeneminen *tox*⁺-isolaatilla oli lähes kaikilla ajanhetkillä (4 h, 8 h, 10 h ja 20 h) merkitsevästi (n. 5–65-kertaisesti) suurempaa (p<0,05) kuin *tox*⁻-isolaatilla (kuvaaja 5, kuvaaja 6). Enimmillään *botA*-geenin ilmeneminen oli noin 65-kertaisesti (p<0,05) suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla ajanhetkellä

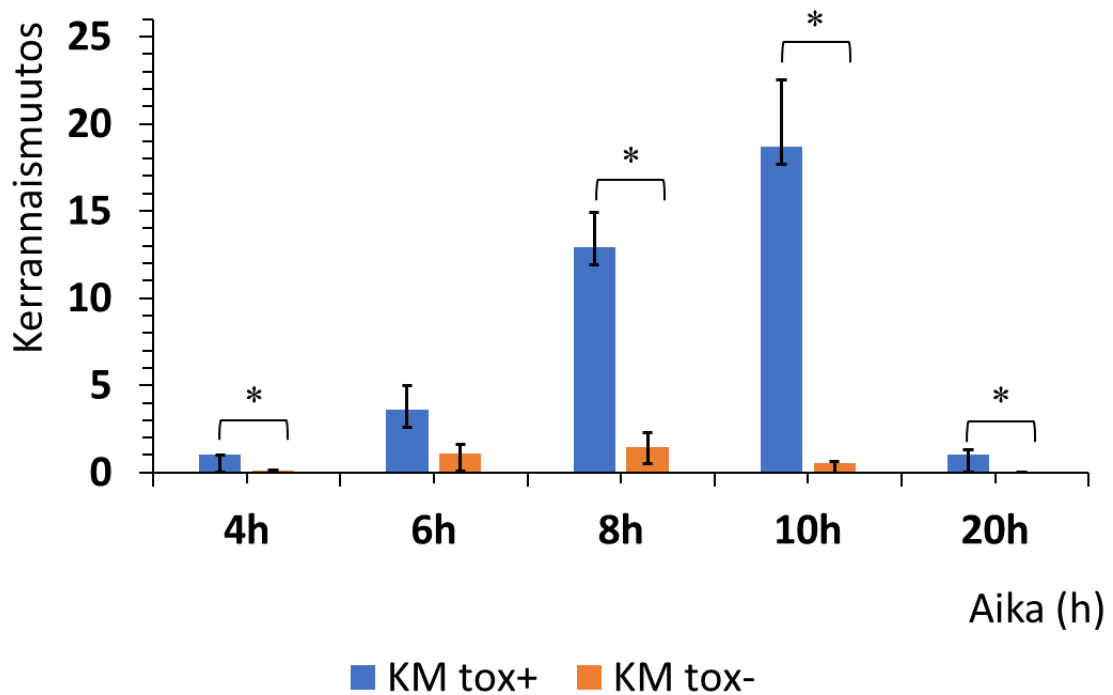
10 h (kuvaaja 5). Geenin ilmentyminen ajanhetkillä 4 h, 8 h ja 20 h oli noin 5–50-kertainen *tox*⁺-isolaatilla verrattuna *tox*⁻-isolaattiin (kuvaaja 5). Tuloksen avulla voitiin selittää aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu *tox*⁻-isolaatin vähentynyt toksiinituotanto *tox*⁺-isolaatin toksiinituotantoon verrattuna. *Tox*⁻ ilmentää botuliinin rakennegeenejä merkitsevästi vähemmän kuin *tox*⁺, ja näin ollen myös sen tuottaman botuliinin määrä on pienempi. Bakterisolujen eksponentiaalisen kasvun vaiheessa myös geenin *botA* ilmeneminen kasvoi eksponentiaalisesti, ja saavutti huippunsa lähes samalla ajanhetkellä (10 h) kuin bakterisolupopulaation koko.



Kuvaaja 5 Isolaattien *tox*⁺ ja *tox*⁻ kerrannaismuutokset (KM) *botA*-geenin ilmenemisen suhteen. Siniset pylväät kuvaavat isolaattia *tox*⁺ ja oranssit pylväät isolaattia *tox*⁻. Enimmillään *botA*-geenin ilmeneminen oli noin 65-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla ajanhetkellä 10 h. Tilastollisesti merkitsevä ero geenin ilmenemisessä isolaattien välillä oli myös ajanhetkillä 4 h, 8 h ja 20 h, jolloin geenin ilmeneminen oli noin 5–50-kertaisesti suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla. * $p < 0,05$.

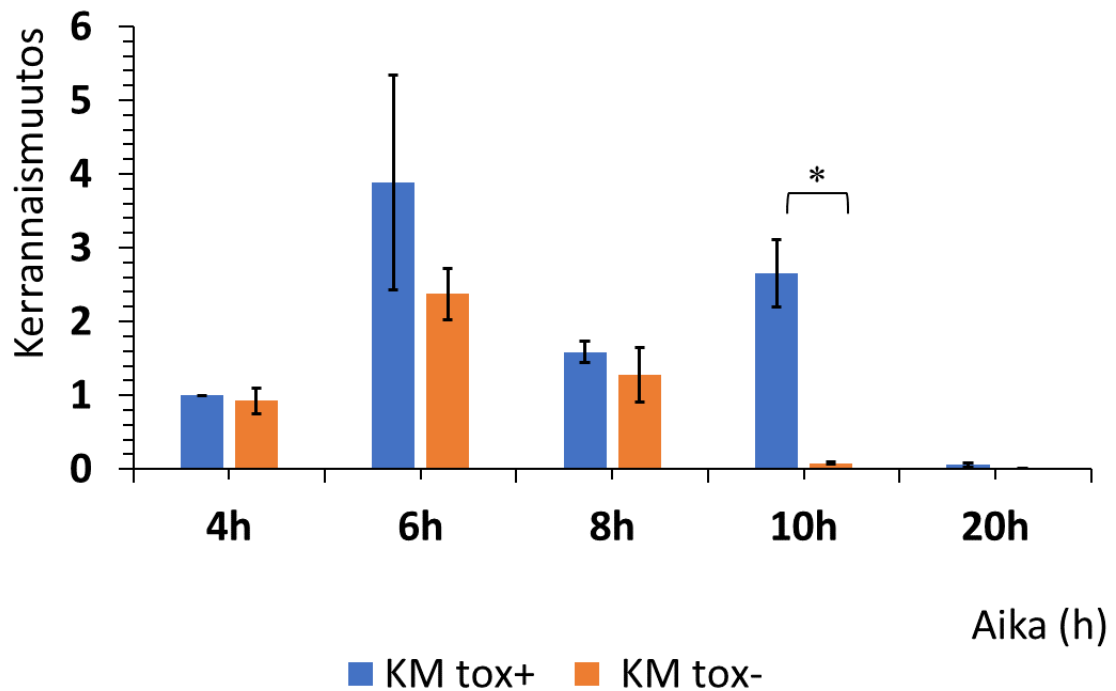
ha33-geenin ilmentyminen isolaateilla oli samankaltaista kuin *botA*-geenillä, ja mukaili muodoltaan bakteri-isolaattien kasvukäyriä, minkä perusteella voitiin päätellä normalisaation onnistuneen RT-qPCR:ssä. Molemmat geenit koodaavat botuliinitoksiinin rakenneosia. *ha33*-geenin ilmentyminen oli enimmillään noin 50-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla ajanhetkellä 20 h

(kuvaaja 6). Ero geenin ilmentymisessä oli tilastollisesti merkitsevä isolaattien välillä myös ajanhetkillä 4 h, 6 h ja 10 h. Tällöin geenin ilmentyminen oli noin 10–35-kertaisesti suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla (kuvaaja 6).



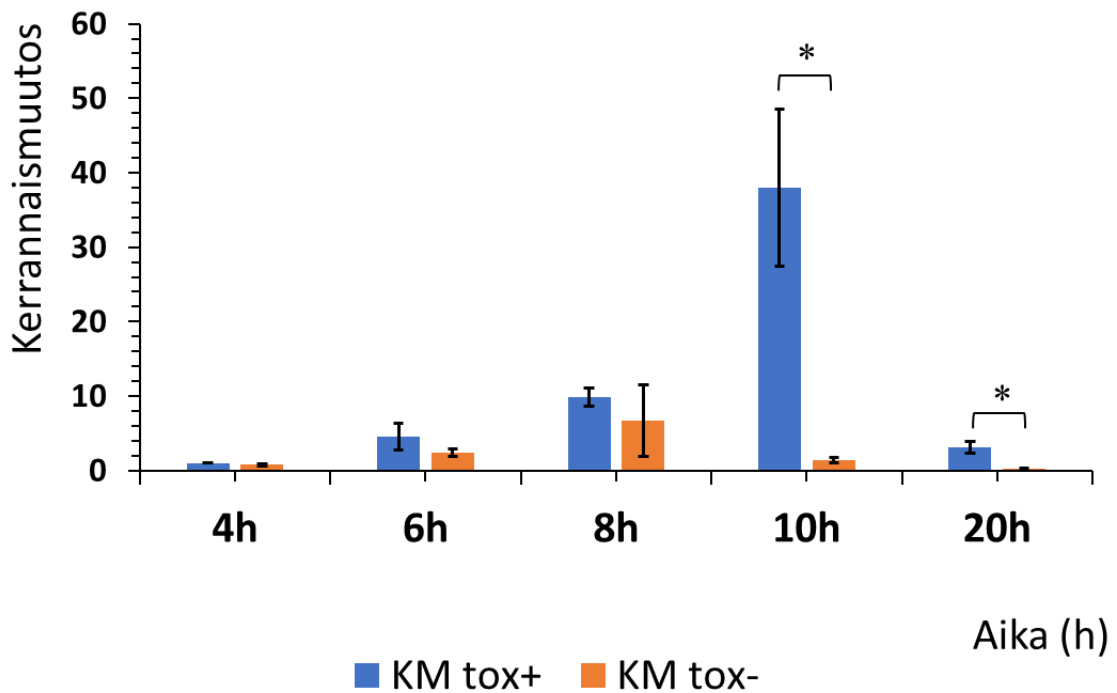
Kuvaaja 6 Isolaattien *tox*⁺ ja *tox*⁻ kerrannaisuutokset (KM) *ha33*-geenin ilmenemisen suhteen. Siniset pylväät kuvaavat isolaattia *tox*⁺ ja oranssit pylväät isolaattia *tox*⁻. *ha33*-geenin ilmentyminen oli enimmillään noin 50-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla ajanhetkellä 20 h. Merkitsevä ero isolaattien välillä oli myös ajanhetkillä 4 h, 6 h ja 10 h. Tällöin geenin ilmentyminen oli noin 10–35-kertaisesti suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla. * $p < 0,05$.

Itiöitymistä säätelevän *spo0A*-geenin ilmeneminen oli enimmillään noin 30-kertaisesti suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla ajanhetkellä 10 h, mutta ero ei ollut näin suuri muissa bakteerin kasvuvaiheissa (kuvaaja 7). Ajanhetkillä 4 h, 6 h, 8 h ja 20 h ero isolaattien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevä, ja geenin ilmentyminen isolaateilla oli samankaltaista.



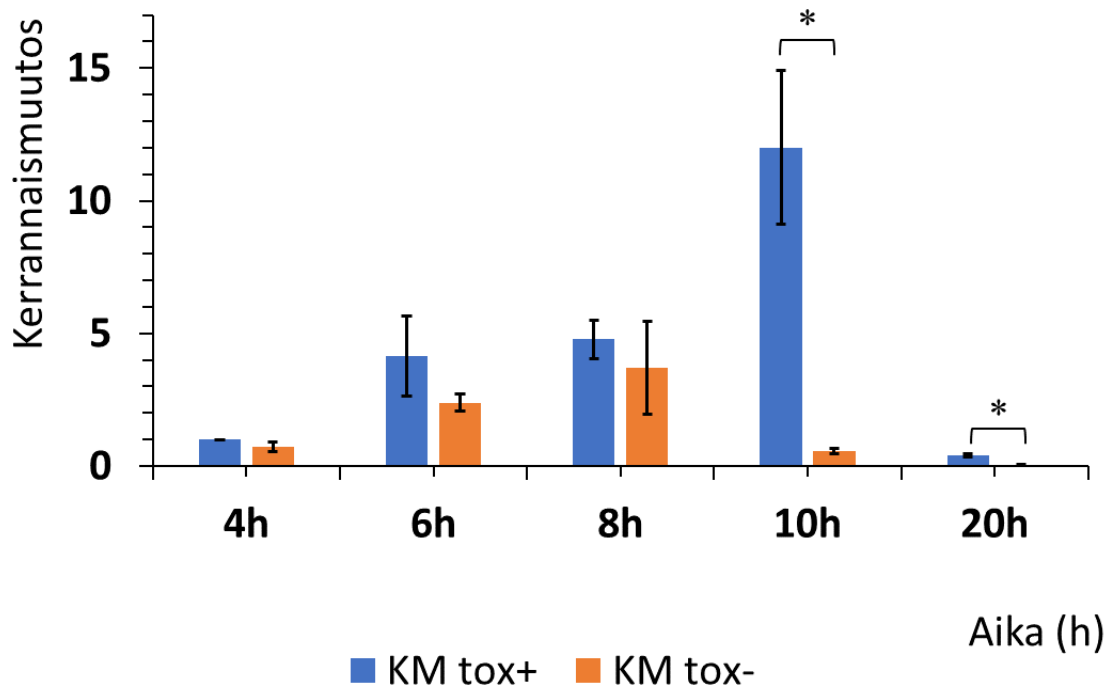
Kuvaaja 7 Isolaattien *tox*⁺ ja *tox*⁻ kerrannaisuusmuutokset (KM) *spo0A*-geenin ilmenemisen suhteen. Siniset pylväät kuvaavat isolaattia *tox*⁺ ja oranssit pylväät isolaattia *tox*⁻. *spo0A*-geenin ilmeneminen oli enimmillään noin 30-kertaisesti suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla ajanhetkellä 10 h, mutta ero ei ollut näin suuri eikä tilastollisesti merkitsevä muissa bakteerin kasvuvaiheissa. * $p < 0,05$.

Itiöitymisen säätely- eli sigmatekijöitä koodaavien geenien (*sigE*, *sigF* ja *sigG*) kohdalla erot geenien ilmentymisessä isolaattien (*tox*⁺ ja *tox*⁻) välillä olivat suurempia kuin *spo0A*-geenin kohdalla. Sigmatekijää SigE koodaavan geenin (*sigE*) kohdalla isolaattien välillä suurin ero geenin ilmenemisessä oli ajanhetkellä 10 h. Tällöin geenin ilmeneminen oli noin 30-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla (kuvaaja 8). Ero geenin ilmenemisessä isolaattien välillä oli merkitsevä myös ajanhetkellä 20 h, jolloin *tox*⁺-isolaatti ilmensi *sigE*-geeniä noin 15-kertaisesti enemmän kuin *tox*⁻-isolaatti (kuvaaja 8). Muissa bakteerin kasvuvaiheissa (4 h, 6 h, 8 h) ero geenin ilmenemisessä isolaattien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevä.



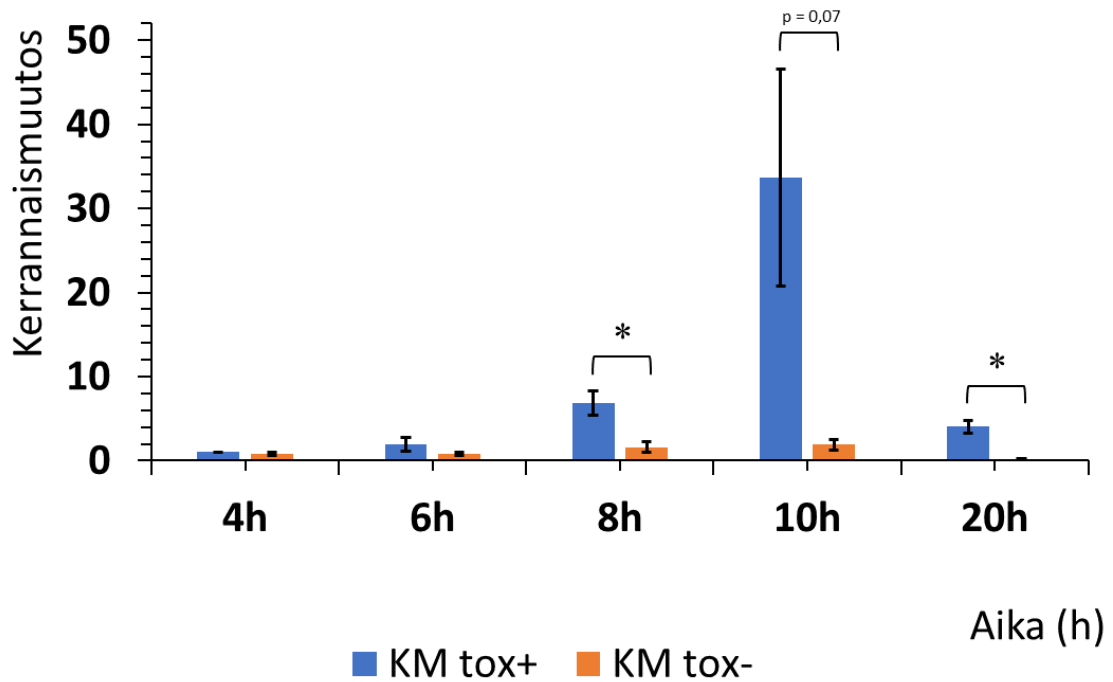
Kuvaaja 8 Isolaattien *tox*⁺ ja *tox*⁻ kerrannaisuutokset (KM) *sigE*-geenin ilmenemisen suhteen. Siniset pylväät kuvaavat isolaattia *tox*⁺ ja oranssit pylväät isolaattia *tox*⁻. Sigmatekijää Sig E koodaavan geenin (*sigE*) kohdalla isolaattien välillä suurin ero geenin ilmenemisessä oli ajanhetkellä 10 h. Tällöin geenin ilmeneminen oli noin 30-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla. Tilastollisesti merkitsevää geenin ilmenemisen ero isolaattien välillä oli myös ajanhetkellä 20 h, jolloin *tox*⁺-isolaatti ilmensi geeniä noin 15-kertaisesti enemmän kuin *tox*⁻-isolaatti. * $p < 0,05$

Sigmatekijää SigF koodaavan geenin *sigF* ilmenemisen ero isolaattien välillä oli enimmillään ajanhetkellä 10 h samoin kuin geenillä *sigE*. Ajanhetkellä 10 h *sigF*-geenin ilmeneminen oli noin 20-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla (kuvaaja 9). Ero geenin ilmenemisessä oli tilastollisesti merkitsevää isolaattien välillä myös ajanhetkellä 20 h. Tällöin geenin ilmeneminen oli noin 10-kertaisesti suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla (kuvaaja 9). Muilla mitatuilla ajanhetkillä (4 h, 6 h, 8 h) ero geenin ilmenemisessä isolaattien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää.



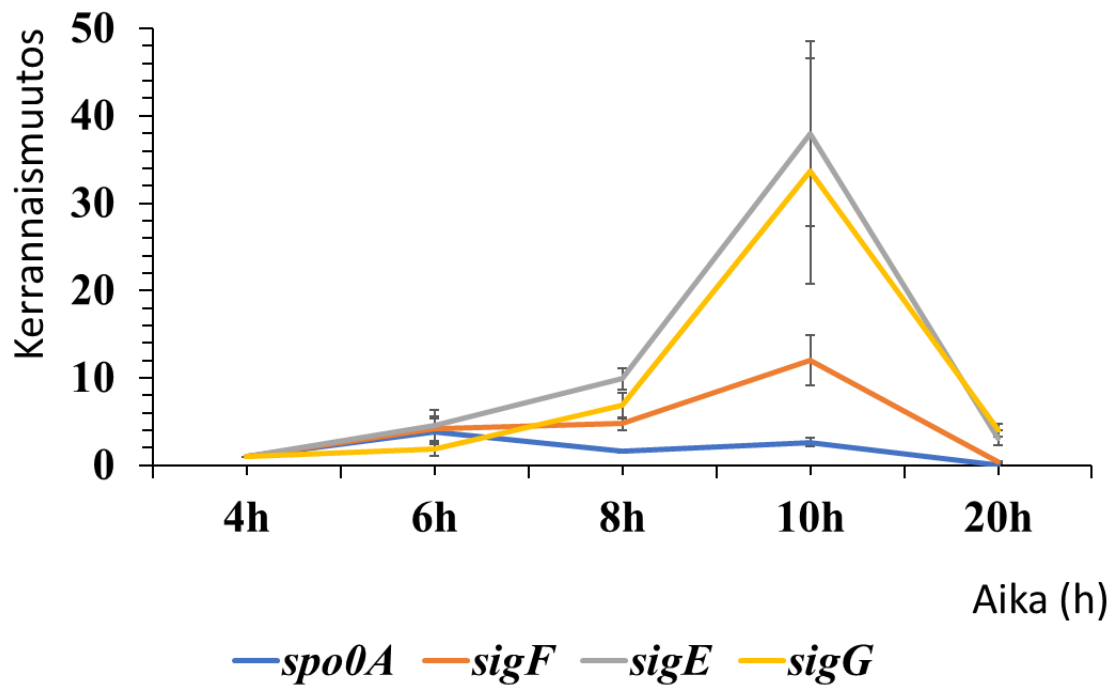
Kuvaaja 9 Isolaattien tox^+ ja tox^- kerrannaisuutokset (KM) *sigF*-geenin ilmenemisen suhteen. Siniset pylväät kuvaavat isolaattia tox^+ ja oranssit pylväät isolaattia tox^- . *sigF*-geenin ilmeneminen oli suurimmillaan ajanhetkellä 10 h noin 20-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa tox^+ -isolaatilla kuin tox^- -isolaatilla. Ero isolaattien välillä oli tilastollisesti merkitsevää myös ajanhetkellä 20 h, jolloin geenin ilmeneminen oli tox^+ -isolaatilla noin 10-kertaisesti suurempaa kuin tox^- -isolaatilla. * $p < 0,05$.

Ero sigmatekijää SigG koodaavan geenin (*sigG*) ilmenemisessä isolaattien välillä oli enemmillään ajanhetkellä 20 h. Tällöin *sigG*-geenin ilmeneminen oli noin 30-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa tox^+ -isolaatilla kuin tox^- -isolaatilla (kuvaaja 10). Ero geenin ilmenemisessä isolaattien välillä oli tilastollisesti merkitsevää myös ajanhetkellä 8 h, jolloin tox^+ -isolaatti ilmensi geeniä noin 5-kertaisesti enemmän kuin tox^- -isolaatti (kuvaaja 10). Ajanhetkellä 10 h ero geenin ilmentämisessä isolaattien välillä oli noin 20-kertainen ($p = 0,07$), mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevää, kuten ei myöskään ajanhetkillä 4 h ja 6 h.

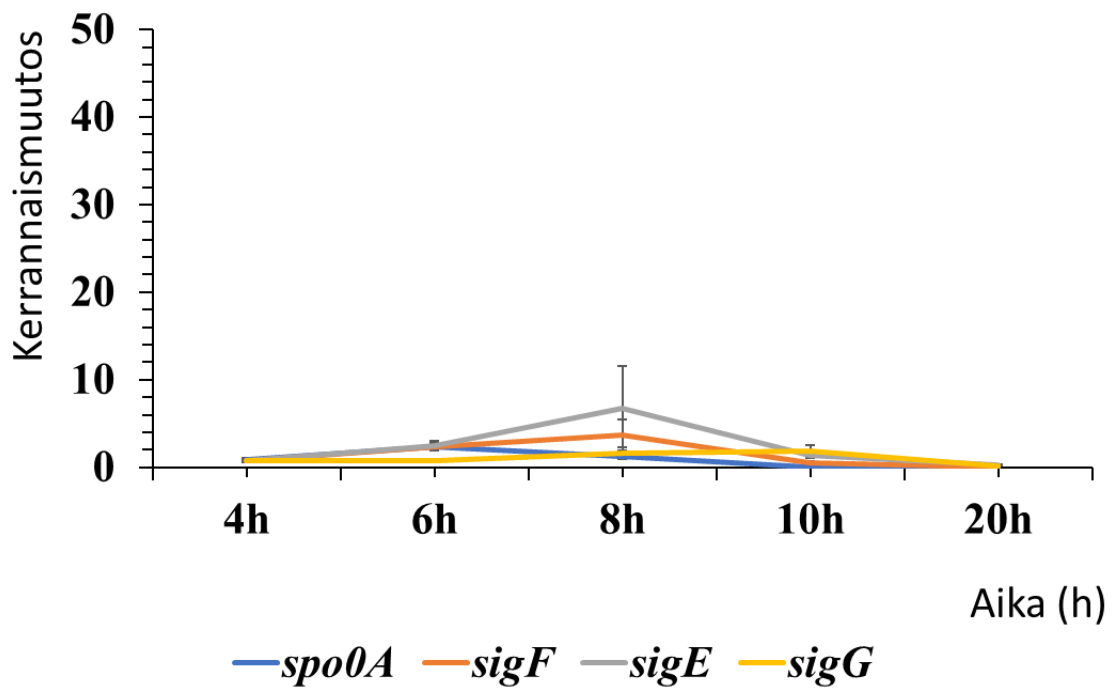


Kuvaaja 10 Isolaattien *tox*⁺ ja *tox*⁻ kerrannaisuusmuutokset (KM) *sigG*-geenin ilmenemisen suhteen. Siniset pylväät kuvaavat isolaattia *tox*⁺ ja oranssit pylväät isolaattia *tox*⁻. Ero sigmatekijää SigG koodaavan geenin (*sigG*) ilmenemisessä isolaattien välillä oli enimmillään ajanhetkellä 20 h. Tällöin *sigG*-geenin ilmeneminen oli noin 30-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla. Tilastollisesti merkitsevää eri isolaattien välillä oli myös ajanhetkellä 8h, jolloin *tox*⁺-isolaatti ilmensi geeniä noin 5-kertaisesti enemmän kuin *tox*⁻-isolaatti. * $p < 0,05$.

Itiöitymisprosessin säätelykaskadissa aktivoituvien sigmatekijöiden ilmeneminen isolaattien välillä oli enimmillään noin 20–30-kertaisesti suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla ajanhetkellä 10 h (kuvaaja 11, kuvaaja 12). Geenien ilmentymisessä isolaattien välillä oli havaittavissa kuvaajista selkeä ero. Itiöitymisen pääsäätelijän Spo0A:n ilmentymisessä ero isolaattien välillä ei kuitenkaan ollut yhtä merkittävä kuin sigmatekijöiden.

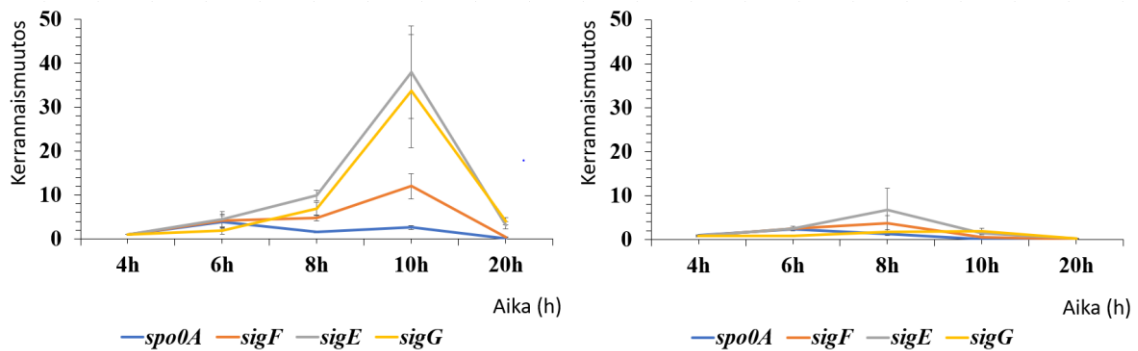


Kuvaaja 11 *C. botulinum*in itiöitymisprosessia säätelevien kohdegeenien (*spo0A*, *sigF*, *sigE* ja *sigG*) ilmeneminen isolaatilla *tox*⁺ mitatuilla ajanhetkillä.



Kuvaaja 12 *C. botulinum*in itiöitymisprosessia säätelevien kohdegeenien (*spo0A*, *sigF*, *sigE* ja *sigG*) ilmeneminen isolaatilla *tox*⁻ mitatuilla ajanhetkillä.

Verrattaessa toisiinsa isolaattien tox^+ ja tox^- itiöitymistä säätelevien geenien (*spo0A*, *sigF*, *sigE* ja *sigG*) ilmentymistä, voitiin huomata selkeä ero sigmatekijöitä kuvaavien kuvaajien muodossa (kuva 7). Vasemmalla on isolaatin tox^+ kuvaaja ja oikealla on isolaatin tox^- kuvaaja (kuva 7).

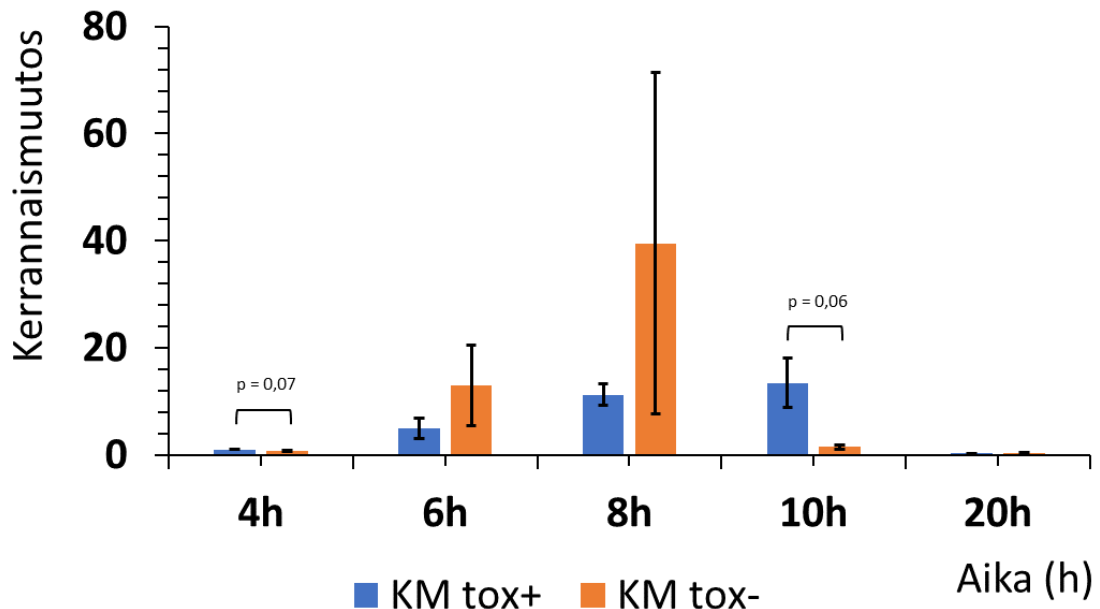


Kuva 7 Itiöitymisprosessia säätelevien geenien esiintyminen tox^+ -isolaatilla verrattuna tox^- -isolaattiin. Vasemmalla on isolaatin tox^+ kuvaaja ja oikealla on isolaatin tox^- kuvaaja. Itiöitymisprosessin säätelykaskadissa aktivoituvien sigmatekijöiden ilmeneminen isolaattien välillä oli enimmillään noin 20–30-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa tox^+ -isolaatilla kuin tox^- -isolaatilla ajanhetkellä 10 h. Itiöitymisen pääsäätelijän Spo0A:n ilmentymisessä ero isolaattien välillä ei kuitenkaan ollut yhtä merkittävä kuin ero sigmatekijöiden ilmentymisessä.

Genomianalyysistä tox^- -isolaatilta löytyneiden mutaatioiden perusteella tutkimukseen valittiin mukaan lisäksi proteaasia koodaava geeni *CBO1443*. Hypoteesi geenin suhteen oli, että isolaatti tox^- ilmentäisi geeniä mahdollisesti vähemmän kuin isolaatti tox^+ , koska sen tiedettiin tuottavan botuliinia huomattavasti vähemmän. Geeni valikoitui tutkimukseen mukaan, koska siitä oli löytynyt genomianalyysin perusteella kaksi pistemutaatiota, ja botuliinin aktivoituminen vaatii toksiinimolekyylin pilkkoutumista proteolyysillä. Proteolyysin seurauksena toksiinimolekyylin kevyt ketju pääsee läpäisemään solukalvon. Ei ole varmaa pilkkooko juuri kyseinen proteaasi toksiinimolekyyliä, mutta mutaatioiden vuoksi sitä haluttiin tutkia.

Geenin *CBO1443* kohdalla ero oli isolaattien välillä suurimmillaan ajanhetkellä 10 h, jolloin tox^+ -isolaatti ilmensi geeniä noin 10-kertaisesti enemmän kuin tox^- -isolaatti ($p = 0,06$) (kuvaaja 13). Ajanhetkillä 4 h ja 20 h tox^+ -isolaatti ilmensi geeniä noin 1–1,5-kertaisesti (4h, $p = 0,07$) verrattuna tox^- -isolaattiin (kuvaaja 13). Ajanhetkillä 6 h ja 8 h tox^- -isolaatti ilmensi geeniä noin 2,5–3,5-kertaisesti enemmän kuin tox^+ -isolaatti (kuvaaja

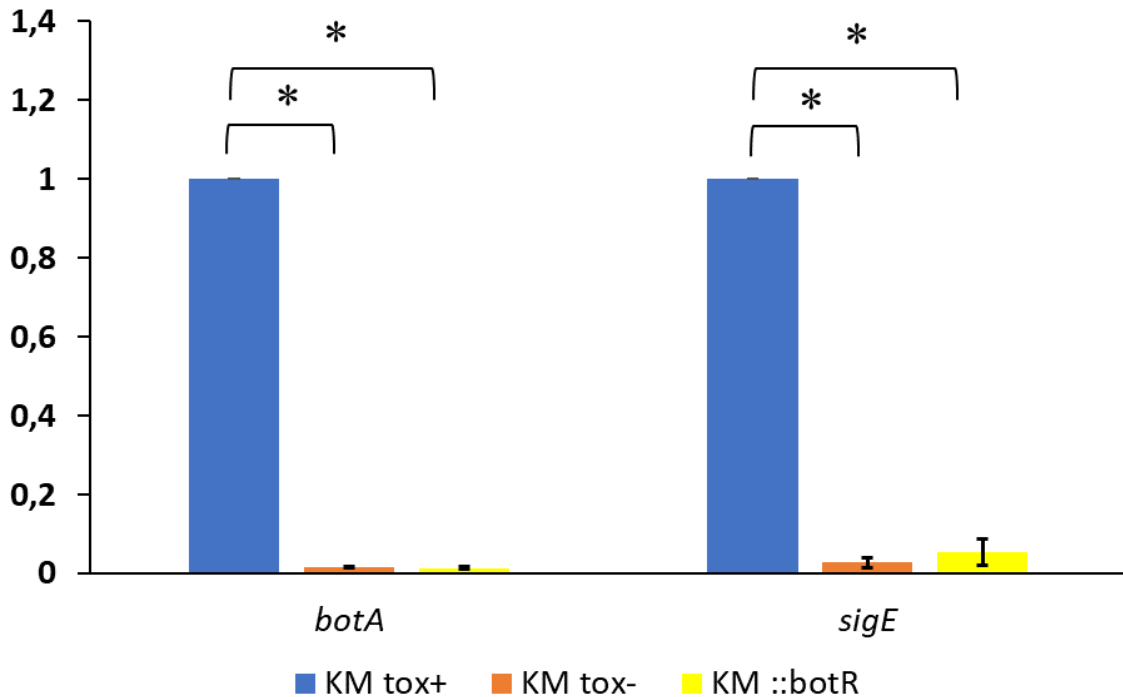
13). *CBO1443*-geenin osalta saadut tulokset eivät olleet millään ajanhetkellä tilastollisesti merkitseviä, eivätkä myöskään luotettavia suuren keskivirheen vuoksi, esimerkiksi ajanhetkellä 8 h. Saatujen tulosten perusteella ei voinut tehdä johtopäätöksiä geenin ilmenemisestä ja sen vaikutuksista solupopulaatioille.



Kuvaaja 13 CBO 1443 –proteasaa koodaavan geenin (*CBO1443*) ilmenemisen ero oli suurimmillaan ajankohdalla 8 h, jolloin se oli noin 10-kertaisesti suurempaa *tox*⁻-isolaatilla kuin *tox*⁺-isolaatilla. Myös ajanhetkellä 6 h *tox*⁻-isolaatti ilmensi geeniä enemmän kuin *tox*⁺-isolaatti. Muina mitattuina ajanhetkinä (4 h, 10 h, 20 h) *tox*⁺-isolaatti ilmensi geeniä enemmän kuin *tox*⁻-isolaatti. Tulokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä kyseisen geenin kohdalla millään mitatuista ajanhetkistä. Saadut tulokset eivät olleet suuruudeltaan merkittäviä, eivätkä myöskään luotettavia suuren keskivirheen vuoksi esimerkiksi ajanhetkellä 8 h.

Mutatoidun isolaatin (:::*botR*) osalta tutkittiin botuliinin rakennegeenin *botA* ja sigmatekijää SigE koodaavan geenin *sigE* ilmenemistä verrattuna isolaattiin *tox*⁺ ja isolaattiin *tox*⁻. Kyseiset geenit valikoituivat kohdegeneiksi, koska niiden kohdalla havaittiin suurimmat erot ilmenemisessä isolaattien *tox*⁺ ja *tox*⁻ välillä. Mutatoitu isolaatti ilmensi kyseisiä geenejä lähes yhtä paljon kuin isolaatti *tox*⁻ ja merkitsevästi vähemmän kuin isolaatti *tox*⁺. Ajanhetkellä 10 h geenin *botA* ilmentyminen oli *tox*⁻-isolaatilla noin 75-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa kuin mutatoidulla isolaatilla :::*botR* (kuvaaja 14). Geenin *sigE* ilmentyminen *tox*⁺-isolaatilla taas oli noin 20-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa

kuin mutatoitulla isolaatilla *::botR* (kuvaaja 14). Erot geenien *botA* ja *sigE* ilmentymisessä olivat vähäisiä mutatoituneen isolaatin *::botR* ja spontaanisti mutatoituneen isolaatin *tox⁻* välillä, eivätkä ne olleet tilastollisesti merkitseviä.



Kuvaaja 14 Kuvaajassa nähdään alustavan tutkimuksen tulokset *tox⁺*- ja *tox⁻*-isolaatin sekä mutatoituneen isolaatin (*::botR*) kerrannaismuutoksista (KM) geenien *botA* ja *sigE* suhteen ajanhetkellä 10 h. Ajanhetkellä 10 h geenin *botA* ilmentyminen oli *tox⁺*-isolaatilla noin 75-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa kuin mutatoituneella isolaatilla *::botR*. Geenin *sigE* ilmentyminen *tox⁺*-isolaatilla taas oli noin 20-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa kuin mutatoituneella isolaatilla *::botR*. * $p < 0,05$

6 POHDINTA

Tutkimuksen osassa I *C. botulinumin* bakteerisolulukumäärän ja RNA-konsentraation välillä havaittiin korrelaatio. Muuttujien välinen korrelaatiokerroin oli $R^2 = 0.89$. Tämän perusteella korrelaatio niiden välillä oli selkeä, mutta ei täydellinen. Korrelaatiokertoimen perusteella pystyttiin laskemaan RT-qPCR –menetelmään ja RNA-sekvensointiin tarvittavat RNA-massat.

Saatua tutkimustietoa voidaan hyödyntää jatkossa RNA-sekvensoinnin ja RT-qPCR:n tutkimuskäytössä. Kun tiedetään, kuinka suuri massa RNA:ta haluttuun menetelmään tarvitaan, voidaan saatujen tulosten perusteella laskea soluviljelmään tarvittava bakteerisolumäärä. Vastaavasti tuloksien avulla voidaan laskea, kuinka suuri määrä RNA:ta on mahdollista saada tietyn kokoisesta bakteerisolupopulaatiosta. Korrelaatiokuvaajan tuloksia ei voi ekstrapoloida kuvaajan ulkopuolelle, koska on mahdollista, että esimerkiksi solujen hajoaminen ei solupopulaation kasvaessa ole enää täydellistä. Tämä luonnollisesti vähentää bakteereista saatua RNA-määrää.

Tutkimuksen osassa II saatujen tulosten perusteella voitiin havaita selkeä ero botuliinin rakennegeenien (*botA* ja *ha33*) ja itiöitymisen sigmatekijöitä koodaavien geenien (*sigE*, *sigF* ja *sigG*) ilmenemisessä *C. botulinum* ATCC 3502 -kannan isolaateilla *tox*⁺ ja *tox*⁻. Genomianalyysin perusteella tiedettiin ennestään, että isolaatilla *tox*⁻ on vaihtoehtoista sigmatekijää BotR koodaavassa geenissä (*botR*) geenin lukukehyksen muuttava insertiomutaatio. Saadut tulokset geenien ilmenemisessä tutkituilla isolaateilla olivat hypoteesin mukaisia.

Botuliinin rakennegeenien (*botA* ja *ha33*) osalta ero isolaattien välillä oli enimmillään noin 50–65-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempi *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla. Saatu tulos selittää isolaattien erilaiset fenotyypit toksiinituotannon suhteen. Spontaanisti mutatoitunut isolaatti *tox*⁻ tuottaa toksiinia huomattavasti vähemmän kuin isolaatti *tox*⁺, joten se tuottaa myös vähemmän botuliinin rakennegeenejä. Sigmatekijöitä koodaavien geenien (*sigE*, *sigF*, *sigG*) osalta ero isolaattien välillä oli suurimmillaan noin 20–30-kertainen ($p < 0,05$) *tox*⁺-isolaatilla verrattuna *tox*⁻-isolaattiin. Ero sigmatekijöitä koodaavien geenien ilmenemisessä selittää isolaatin *tox*⁻ heikentyneen kyvyn itiöityä, koska ne ovat välttämättömiä itiöitymisprosessissa ja itiön rakenteiden muodostumisessa.

spo0A-geenin, eli itiöitymisen pääsäätelijän kohdalla, ilmentyminen oli enimmillään noin 30-kertaisesti suurempaa *tox*⁺-isolaatilla kuin *tox*⁻-isolaatilla. Ero *spo0A*:n ilmenemisessä isolaattien välillä ei myöskään ollut niin suuri kuin sigmatekijöitä koodaavien geenien (*sigF*, *sigE*, *sigG*) osalta, eikä se ollut tilastollisesti merkitsevä kuin yhdellä mitatuista ajanhetkistä (10 h). Tämän tuloksen seurauksena voidaan pohtia, käynnistyisikö mutatoituneen isolaatin *tox*⁻ itiöitymisprosessi kuitenkin *spo0A*-geenin transkriptiolla, mutta keskeytyisi sen vuoksi, että Spo0A ei fosforyloituisikaan täydellisesti, eikä näin

ollen pystyisi edelleen aktivoimaan normaalisti sigmatekijäkaskadia. Orpokinaasien ajatellaan tällä hetkellä osallistuvan Spo0A:n fosforyloitumisprosessiin *C. botulinumilla* (Sebahia ym. 2007). Vaihtoehtoisen sigmatekijän BotR mutaatio voisi siis esimerkiksi estää Spo0A:n fosforyloitumista vaikuttamalla negatiivisesti orpokinaasien toimintaan, ja edelleen itiöitymisprosessiin.

Vastaavasti Spo0A:n on todettu vaikuttavan positiivisesti botuliinitoksiinin tuotantoon *C. botulinumin* Beluga-kannalla (Mascher ym. 2017). Tutkimuksessa *spo0A*:n inaktivaatio johti botuliinitoksiinituotannon huomattavaan vähentymiseen, ja itiöitymisen voimakkaaseen vähentymiseen tai jopa loppumiseen verrattuna villin tyypin kontrollikantoihin (Mascher ym. 2017). *C. botulinumin* itiöitymisprosessi ja toksiinintuotanto linkittyvät siis toisiinsa useaa eri reittiä pitkin, ja vaikuttavat näin toinen toisensa säätelyyn.

On todennäköistä, että *C. botulinumin* itiöitymistä säätelevä sigmatekijäkaskadi osallistuu myös toksiinituotannon säätelyyn. *C. perfringensillä* sigmatekijöiden SigE, SigF ja SigK on todettu osallistuvan enterotoksiinituotantoon (Harry ym. 2009, Li & McClane 2010). *C. botulinumilta* ja *C. perfringensiltä* on löydetty aikaisemmin yhteneviä *agr*-lokuksen geenejä, jotka osallistuvat molemmilla bakteereilla toksiinituotannon säätelyyn (Ohtani & Shimizu 2016, Vidal ym. 2009). *C. botulinumin* toksiinituotannolla ja itiöitymisellä on siis hyvin todennäköisesti yhteisiä säätelymekanismeja ja -signaaleja. Mutaatio BotR-sigmatetekijässä vaikuttaa todennäköisesti myös itiöitymisprosessin säätelyyn. Tämä voisi osaltaan selittää isolaatin *tox*⁻ muuttuneen kyvyn itiöityä sigmatekijöiden vähentyneen geeniekspression ohella. Myös *Streptomyces coelicolor* -lajin TetR-perheeseen kuuluvan säätelytekijän SCO3201 liikatuotannon heikentävä vaikutus sen metaboliareittien ja itiöitymisprosessin toimintaan herättää kysymyksen BotR:n osuudesta *C. botulinumin* itiöitymisprosessin säätelyyn (Xu ym. 2010).

Alustavassa tutkimuksessa *Clostron*-menetelmällä mutatoitu BotR-isolaatti (*::botR*) ilmensi geenejä *botA* ja *sigE* lähes yhtä paljon ajanhetkellä 10 h kuin *tox*⁻-isolaatti, ja merkittävästi vähemmän molempina ajanhetkinä kuin isolaatti *tox*⁺. Ajanhetkellä 10 h geenin *botA* ilmentyminen oli *tox*⁺-isolaatilla noin 75-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa kuin mutatoitulla isolaatilla *::botR*. Geenin *sigE* ilmentyminen *tox*⁺-isolaatilla taas oli

noin 20-kertaisesti ($p < 0,05$) suurempaa kuin mutatoitulla isolaatilla *::botR*. Myös tämä tulos vahvistaa, että vaihtoehtoista sigmatekijää BotR koodaava geeni *botR* vaikuttaa sekä *C. botulinum*in toksiinituotannon että itiöitymisprosessin säätelyyn. Osalla *C. botulinum* –kannoista tärkeänä tekijänä näiden prosessien välillä toimii siis vaihtoehtoinen sigmatekijä BotR, joka toksiinituotannon säätelyn lisäksi linkittyy myös itiöitymisprosessin säätelyyn mitä todennäköisimmin orpokinaasien välityksellä säätelemällä Spo0A:n fosforyloitumista.

Hypoteesin varmistamiseksi isolaattia *::botR* tulee tutkia lisää, ja verrata isolaattiin *tox⁻* myös muiden toksiinituotantoon ja itiöitymiseen liittyvien geenien osalta. Lisäksi jatkossa tulee tutkia ovatko isolaatin *::botR* fenotyyppi toksiinituotannon ja itiöitymisen osalta samanlainen kuin isolaatilla *tox⁻*.

Kaikkien kolmen tutkimuksessa käytetyn isolaatin kasvukäyrät olivat muodoltaan samankaltaiset, eivätkä merkittävästi eronneet toisistaan. Tämän perusteella voitiin päätellä, että *tox⁻*-isolaatin genomista löytyneet mutaatiot ja *::botR*-isolaatin genotyyppi (*botR*-geenin *Clostron*-mutaatio) eivät ole vaikuttaneet merkittävästi solupopulaatioiden kasvu- ja elinkykyyn. Toksiinituotannon säätelyreitit eivät siis vaikuta merkittävästi *C. botulinum*in metabolian säätelyyn.

7 KIITOKSET

Haluan kiittää Dr. François Douillardia lisensiaatin tutkielmani ohjaamisesta ja *C. botulinum* –tutkimusryhmän johtajaa Prof. Miia Lindströmiä tutkielmani johtamisesta. Lisäksi haluan kiittää elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden (EHYT) -osastoa tästä upeasta mahdollisuudesta osallistua kesäkouluun, ja kirjoittaa lisensiaatin tutkielma osaston alaisuudessa. Kiitos lisäksi kesäkoulun vetäjille organisoinnista, ja kaikille EHYT-kesäkoululaisille henkisestä tuesta projektin aikana.

8 LÄHTEET

Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET. The *Clostridium* sporulation programs: diversity and preservation of endospore differentiation. Microbiol Mol Biol R 2015, 79: 19–37.

Arnold T. Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa. Aust Vet J 1928, 4: 66–74.

Arnon SS. Infant Botulism. Annu Rev Med 1980. 31: 541–560.

Arnon SS, Payne JR, Drummond Y, Barash JR. Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism: The first four years post-licensure. Toxicon 2008, 51: 8–9.

Artin I, Carter AT, Holst E, Lövenklev M, Mason DR, Peck MW, Rådström P. Effects of carbon dioxide on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type E. Appl Environ Microbiol 2008, 74: 2391–2397.

Artin I, Mason DR, Pin C, Schelin J, Peck MW, Holst E, Rådström P, Carter AT. Effects of carbon dioxide on growth of proteolytic *Clostridium botulinum*, its ability to produce neurotoxin, and its transcriptome. Appl Environ Microbiol 2010, 76: 1168–1172.

Bakheit AM, Ward CD, McLellan DL. Generalised botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum toxin type A: a report of two cases. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1997, 62: 198.

Baranyi J, Roberts TA, McClure P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiol 1993, 10: 43–59.

Barash JR, Arnon SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. J Infect Dis 2014, 209: 183–191.

Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, McWilliams LG, Schmidt JG, Martinez RA, Ashley DL. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. Emerg Infect Dis 2005, 11: 1578–1583.

Bengtson IA. Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvæ of *Lucilia cæsar*. Public Health Rep 1922, 37: 164–170.

Berntsson RP-A, Peng L, Dong M, Stenmark P. Structure of receptor binding to botulinum neurotoxin B. *Nat Commun* 2013, 4: 2058.

Bhandari M, Campbell KD, Collins MD, East AK. Molecular characterization of the clusters of genes encoding the botulinum neurotoxin complex in *Clostridium botulinum* (*Clostridium argentinense*) type G and nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B. *Curr Microbiol* 1997. 35: 207–214.

Binz T, Blasi J, Yamasaki S, Baumeister A, Link E, Südhof TC, Jahn R, Niemann H. Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxin. *J Biol Chem* 1994, 269: 1617–1620.

Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* 1993, 12: 4821–4828.

Bonventre PF, Kempe LL. Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B. IV. Activation of the toxin. *J Bacteriol* 1959, 79: 24–32.

Boroff DA. Study of toxins of *Clostridium botulinum* III. Relation of autolysis to toxin production. *J Bacteriol* 1955, 70: 363–367.

Bradshaw M, Dineen SS, Maks ND, Johnson EA. Regulation of neurotoxin complex expression in *Clostridium botulinum* strains 62A, Hall A-hyper, and NCTC 2916. *Anaerobe* 2004, 10: 321–333.

Brin MF. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve. Supplement* 1997, 6: 146.

Brunt J, Plowman J, Gaskin DJH, Itchner M, Carter AT, Peck MW. Functional characterisation of germinant receptors in *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* presents novel insights into spore germination systems. *PLoS Pathog* 2014, 10: e1004382.

Burbulys D, Trach KA, Hoch JA. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 1991, 64: 545–552.

Burgen ASV, Dickens F, Zatman LJ. The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J Physiol* 1949, 1: 10–24.

Burningham MD, Walter FG, Mechem C, Haber J, Ekins BR. Wound botulism. *Ann Emerg Med* 1994, 24: 1184–1187.

Chen Y, Korkeala H, Lindén J, Lindström M. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis reveals stable and prolonged neurotoxin cluster gene activity in a *Clostridium botulinum* type E strain at refrigeration temperature. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74: 6132–6137.

Centers for Disease Control and Prevention, (CDC). Wound botulism--California, 1995. *MMWR-Morbid Mortal W* 1995, 44: 889–892.

Centers for Disease Control and Prevention, (CDC). Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR Recomm Rep* 1997, 46: 1–55.

Centers for Disease Control and Prevention, (CDC). Investigational Heptavalent Botulinum Antitoxin (HBAT) to replace licensed botulinum antitoxin AB and investigational botulinum antitoxin E. *MMWR-Morbid Mortal W* 2010, 59: 299.

Chertow DS, Tan ET, Maslanka SE, Schulte J, Bresnitz EA, Weisman RS, Bernstein J, Marcus SM, Kumar S, Malecki J, Sobel J, Braden CR. Botulism in 4 adults following cosmetic injections with an unlicensed, highly concentrated botulinum preparation. *JAMA* 2006, 296: 2476–2479.

Chia JK, Clark JB, Ryan CA, Pollack M. Botulism in an adult associated with foodborne intestinal infection with *Clostridium botulinum*. *New Engl J Med* 1986, 315: 239–241.

Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the foodborne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J Appl Microbiol* 1998, 84: 5–17.

Connan C, Brüggemann H, Mazuet C, Raffestin S, Cayet N, Popoff MR. Two-component systems are involved in the regulation of botulinum neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* type A strain Hall. *PloS One* 2012, 7: e41848.

Cooksley CM, Davis IJ, Winzer K, Chan WC, Peck MW, Minton NP. Regulation of neurotoxin production and sporulation by a putative agrBD signaling system in proteolytic *Clostridium botulinum*. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76: 4448–4460.

Critchley EM. A comparison of human and animal botulism: a review. *J Roy Soc Med* 1991, 84: 295–298.

Cuëtter AC, El-Feky WH. The clinical picture, nerve conduction studies, and electromyographic findings in 15 patients with foodborne botulism type A. *Neurology* 1999, 52: 382.

Dabritz HA, Hill KK, Barash JR, Ticknor LO, Helma CH, Dover N, Payne JR, Arnon SS.

Molecular epidemiology of infant botulism in California and elsewhere, 1976–2010. *J Infect Dis* 2014, 210: 1711–1722.

DasGupta BR, Sugiyama H. A common subunit structure in *Clostridium botulinum* type A, B and E toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 1972, 48: 108–112.

Derman Y, Korkeala H, Salo E, Lönnqvist T, Saxen H, Lindström M. Infant botulism with prolonged faecal excretion of botulinum neurotoxin and *Clostridium botulinum* for 7 months. *Epidemiol Infect* 2014, 142: 335–339.

Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 2006, 312: 592–596.

Dong M, Liu H, Tepp WH, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol Biol Cell* 2008, 19: 5226–5237.

Dover N, Barash JR, Hill KK, Xie G, Arnon SS. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J Infect Dis* 2014, 209: 192–202.

East AK, Bhandari M, Stacey JM, Campbell KD, Collins MD. Organization and phylogenetic interrelationships of genes encoding components of the botulinum toxin complex in proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B, and F: evidence of chimeric sequences in the gene encoding the nontoxic nonhemagglutinin component. *Int J Syst Bacteriol* 1996, 46: 1105–1112.

Eisel U, Jarausch W, Goretzki K, Henschen A, Engels J, Weller U, Hudel M, Habermann E, Niemann H. Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J* 1986, 5: 2495–2502.

Eklund MW, Poysky FT, Reed SM. Bacteriophage and the toxigenicity of *Clostridium botulinum* type D. *Nature-New Biol* 1972, 235: 16–17.

Elston HR, Wang M, Loo LK. Arm abscesses caused by *Clostridium botulinum*. *J Clin Microbiol* 1991, 29: 2678–2679.

Erbguth FJ. Botulinum toxin, a historical note. *Lancet* 1998, 331: 1820.

Fawcett P, Eichenberger P, Losick R, Youngman P. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 8063–8068.

Foran PG, Mohammed N, Lisk GO, Nagwaney S, Lawrence GW, Johnson E, Smith L, Aoki KR, Dolly JO. Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B,

C1, E and F compared with the long lasting type A. Basis of distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J Biol Chem* 2003, 278: 1363–1371.

Franciosa G, Fenicia L, Pourshaban M, Aureli P. Recovery of a strain of *Clostridium botulinum* producing both neurotoxin A and neurotoxin B from canned macrobiotic food. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63: 1148–1150.

Franciosa G, Maugliani A, Scalfaro C, Aureli P. Evidence that plasmid-borne botulinum neurotoxin type B genes are widespread among *Clostridium botulinum* serotype B strains. *PLoS One* 2009, 4: e4829.

Fredrick CM, Lin G, Johnson EA. Regulation of botulinum neurotoxin synthesis and toxin complex formation by arginine and glucose in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *Appl Environ Microbiol* 2017, 83: e00642–17.

Fu Z, Chen C, Barbieri JT, Kim JP, Baldwin MR. Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. *Biochemistry* 2009, 48: 5631–5641.

Grazzi L, Usai S. Botulinum toxin A: a new option for treatment of chronic migraine with medication overuse. *Neurol Sci* 2014, 35: 37–39.

Green J, Spear H, Brinson RR. Human botulism (type F)—a rare type. *Am J Med* 1983, 75: 893–895.

Griffin PM, Hatheway CL, Rosenbaum RB, Sokolow R. Endogenous antibody production to botulinum toxin in an adult with intestinal colonization botulism and underlying Crohn's disease. *J Infect Dis* 1997, 175: 633–637.

Gu S, Rumpel S, Zhou J, Strotmeier J, Bigalke H, Perry K, Shoemaker CB, Rummel A, Jin R. Botulinum neurotoxin in shielded by NTNHA in an interlocked complex. *Science* 2012, 335: 977–981.

Gu S, Jin R. Assembly and function of the botulinum neurotoxin progenitor complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013, 364: 10.

Hall JD, McCroskey LM, Pincomb BJ, Hatheway CL. Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. *J Clin Microbiol* 1985, 21: 654–655.

Hannett GE, Stone WB, Davis SW, Wroblewski D. Biodiversity of *Clostridium botulinum* type E associated with a large outbreak of botulism in wildlife from Lake Erie and Lake Ontario. *Appl Environ Microbiol* 2011, 77: 1061–1068.

Harry KH, Zhou R, Kroos R, Melville SB. Sporulation and enterotoxin (CPE) synthesis are controlled by the sporulation-specific sigma factors SigE and SigK in *Clostridium perfringens*. J Bacteriol 2009, 191: 2728–2742.

Hatheway CL. *Clostridium botulinum* and other Clostridia that produce botulinum neurotoxin. Teoksessa: Hauschild AHD, Dodds KL (toim.). *Clostridium botulinum*–ecology and control in foods. Marcel Dekker, New York, N.Y. 1992: 3–20.

Hatheway C, McCroskey L. Examination of feces and serum for diagnosis of infant botulism in 336 patients. J Clin Microbiol 1987, 25: 2334–2338.

Hauschild AH, Gauvreau L. Foodborne botulism in Canada, 1971-84. Can Med Assoc J 1985, 133: 1141–1146.

Hielm S, Björkroth J, Hyytiä E, Korkeala H. Prevalence of *Clostridium botulinum* in finnish trout farms: pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. Appl Environ Microbiol 1998, 64: 4161–4167.

Hilbert DW, Piggot PJ. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. Microbiol Mol Biol R 2004, 68: 234–262.

Hill KK, Xie G, Foley BT, Smith TJ, Munk AC, Bruce D, Smith LA, Bretin TS, Detter JC. Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* types A, B, E and F and *Clostridium butyricum* type E strains. BMC Biol 2009, 7: 66.

Henderson I, Whelan SM, Davis TO, Minton NP. Genetic characterisation of the botulinum toxin complex of *Clostridium botulinum* strain NCTC 2916. FEMS Microbiol Lett 1996, 140: 151–158.

Hoch JA. Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. Annu Rev Microbiol 1993, 47: 441–465.

Horowitz BZ. Type E botulism. Clin Toxicol 2010, 48: 880–895.

Ihekweba AEC, Mura I, Walshaw J, Peck MW, Barker GC. An interactive approach to computational modelling of the gene regulatory network controlling *Clostridium botulinum* type A1 toxin production. PLoS Comput Biol 2016, 12: e1005205.

Ito H, Sagane Y, Miyata K, Inui K, Matsuo T, Horiuchi R, Ikeda T, Suzuki T, Hasegawa K, Kouguchi H, Oguma K, Niwa K, Ohyama T, Watanabe T. HA-33 facilitates transport

of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011, 61: 323–331.

Jacobson MJ, Lin G, Raphael B, Andreadis J, Johnson EA. Analysis of neurotoxin cluster genes in *Clostridium botulinum* strains producing botulinum neurotoxin serotype A subtypes. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74: 2778–2786.

Jalava K, Selby K, Pihlajasaari A, Kolho E, Dahlsten E, Forss N, Bäcklund T, Korkeala H, Honkanen-Buzalski T, Hulkko T, Derman Y, Järvinen A, Kotilainen H, Kultanen L, Ruutu P, Lyytikäinen O, Lindström M. Two cases of food-borne botulism in Finland caused by conserved olives, October 2011. *Euro Surveill* 2011, 16: 20034.

Kalb S, Baudys J, Smith T, Smith L, Barr J. *Clostridium botulinum* strain Af84 produces three enzymatically active neurotoxins: BoNT/A2, BoNT/F4, and BoNT/F5. *Anal Chem* 2014, 86: 3254–3262.

Kirk DG, Zhang Z, Korkeala H, Lindström M. Alternative sigma factors SigF, SigE, and SigG are essential for sporulation in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *Appl Environ Microbiol* 2014, 80: 5141–5150.

Kroos L. The Bacillus and Myxococcus developmental networks and their transcriptional regulators. *Annu Rev Genet*, 2007, 41: 13–39.

Leyer GJ, Johnson EA. Repression of toxin production by tryptophan in *Clostridium botulinum* type E. *Arch Microbiol* 1990, 154: 443–447.

Li J, McClane BA. Evaluating the involvement of alternative sigma factors SigF and SigG in *Clostridium perfringens* sporulation and enterotoxin synthesis. *Infect Immun* 2010, 78: 4286–4293.

Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Mikrobiol Rev* 2006, 19: 298–314.

Lindström M, Myllykoski J, Sivelä S, Korkeala H. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *CRC Cr Rev Food Sci* 2010, 50: 281.

MacDonald KL, Rutherford GW, Friedman SM, Dietz JR, Kaye BR, McKinley GF, Tenny JH, Cohen ML. Botulism and botulism-like illness in chronic drug abusers. *Ann Emerg Med* 1985, 14: 933.

Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B, Binz T. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 2006, 580: 2011–2014.

Marshall KM, Bradshaw M, Pellett S, Johnson EA. Plasmid encoded neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* serotype A subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 361: 49–54.

Marvaud JC, Gibert M, Inoue K, Fujinaga Y, Oguma K, Popoff MR. botR/A is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated non-toxin protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Mol Microbiol* 1998. 29: 1009–1018.

Mascher G, Mertaola A, Korkeala H, Lindström M. Neurotoxin synthesis is positively regulated by the sporulation transcription factor Spo0A in *Clostridium botulinum* type E. *Environ Microbiol* 2017, 19: 4287–4300.

Maslanka SE, Lúquez C, Dykes JK, Tepp WH, Pier CL, Pellett S, Raphael BH, Kalb SR, Barr JR, Rao A, Johnson EA. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. *J Infect Dis* 2016, 213: 379–385.

Matsumura T, Jin Y, Kabumoto Y, Takegahara Y, Oguma K, Lencer WI, Fujinaga Y. The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell Microbiol* 2008, 10: 355–364.

Mazuet C, Sautereau J, Legeay C, Bouchier C, Bouvet P, Popoff MR. An atypical outbreak of foodborne botulism due to *Clostridium botulinum* types B and E from ham. *J Clin Microbiol* 2015, 53: 722–726.

McCroskey LM, Hatheway CL. Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract. *J Clin Microbiol* 1988, 26: 1052–1054.

McCroskey L, Hatheway C, Fenicia L, Pasolini B, Aureli P. Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. *J Clin Microbiol* 1986, 23: 201–202.

McCroskey LM, Hatheway CL, Woodruff BA, Greenberg JA, Jurgenson P. Type F botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult. 1991. 29: 2618–2620.

Midura TF. Update: infant botulism. *Clin Microbiol Rev* 1996. 9: 119–125.

Montecucco C. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem Sci* 1986, 11: 314–317.

Montecucco C, Schiavo G. Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem Sci* 1993, 18: 324–327.

Morris JG jr, Snyder JD, Wilson R, Feldman RA. Infant botulism in the United States: an epidemiologic study of cases occurring outside of California. *Am J Public Health* 1983, 73: 1385–1388.

Myllykoski J, Nevas M, Lindström Miia, Korkeala Hannu. The detection and prevalence of *Clostridium botulinum* in pig intestinal samples. *Int J Food Microbiol* 2006, 110: 172–177.

Münchau A, Bhatia KP,. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *Clinical Review. BMJ Brit Med J* 2000, 320: 161.

Narula J, Devi SN, Fujita M, Igoshin OA. Ultrasensitive of the *Bacillus subtilis* sporulation decision. *P Nat Acad Sci USA* 2012, 109: 20196–20197.

Nevas M, Lindström M, Virtanen A, Hielm S, Kuusi M, Arnon SS, Vuori E, Korkeala H. Infant botulism acquired from household dust presenting as Sudden Infant Death Syndrome. *J Clin Microbiol* 2005, 43: 511–513.

Nigam PK, Nigam A. The action of botulin toxin on neuromuscular junctions. *Indian J Dermatol* 2010, 55: 8–14.

Notermans S, Dufrenne J, Oosterom J. Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism. *Appl Environ Microbiol* 1981, 41: 179–183.

Oh HM, Chung ME. Botulinum toxin for neuropathic pain: a review of the literature. *Toxins* 2015, 7: 3127–3154.

Ohtani K, Shimizu T. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. *Toxins* 2016, 8: 207.

Pandian SJ, Subramanian M, Vijayakumar G, Balasubramaniam GA, Sukumar K. Therapeutic management of botulism in dairy cattle. *Vet World* 2015, 8: 1305–1309.

Patterson-Curtis SI, Johnson EA. Regulation of neurotoxin and protease formation in *Clostridium botulinum* Okra B and Hall A by arginine. *Appl Environ Microbiol* 1989, 55: 1544–1548.

Peck MW. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J Appl Microbiol* 2006, 101: 556–570.

Peck MW, Stringer SC. The safety of pasteurised in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. *Meat Sci* 2005, 70: 461–475.

Peck MW, Stringer SC, Carter AT. *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. *Food Microbiol* 2011, 28: 183–191.

Peng L, Tepp WH, Johnson EA, Dong M. Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog* 2011, 7: e1002008.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29: 45.

Piggot PJ, Coote JG. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol Rev* 1976, 40: 908–962.

Proverbio MR, Lamba M, Rossi A, Siani P. Early diagnosis and treatment in a child with foodborne botulism. *Anaerobe* 2016, 39: 189–192.

Raffestin S, Marvaud JC, Cerrato R, Dupuy B, Popoff MR. Organization and regulation of the neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *Anaerobe* 2004, 10: 93–100.

Rafie S, Salmanzadeh S, Mehramiri A, Nejati A. Botulism outbreak in a family after ingestion of locally produced cheese. *Iran J Med Sci* 2017, 42: 201–204.

Raphael BH, Luquez C, McCroskey LM, Joseph LA, Jacobson MJ, Johnson EA, Maslanka SE, Andreadis JD. Genetic homogeneity of *Clostridium botulinum* type A1 strains with unique toxin gene clusters. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74: 4390–4397.

Roblot P, Roblot F, Fauchere JL, Devilleger A, Marechaud R, Breux JP, Grollier G, Becq-Giraudon B. Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers, France. *J Med Microbiol* 1994, 40: 379–384.

Rosen O, Feldberg L, Gura S, Brosh-Nissimov T, Guri A, Zimhony O, Shapiro E, Beth-Din A, Stein D, Ozeri E, Barnea A, Turgeman A, Ben David A, Schwartz A, Elhanany E, Diamant E, Yitzhaki S, Zichel R. Early, real-time medical diagnosis of botulism by endopeptidase-mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2015, 15: e58–61.

Rosow LK, Strober JB. Infant botulism: review and clinical update. *Pediatr Neurol* 2015, 52: 487–492.

Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Micro* 2014, 12: 535–549.

Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, Binz T. Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem* 2004, 279: 30865–70.

Rummel A, Häfner K, Mahrhold S, Darashchonak N, Holt M, Jahn R, Beerman S, Karnath T, Bigalke H, Binz T. Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J Neurochem* 2009, 110: 1942–1954.

Sagane Y, Inui K, Miyashita S-I, Miyata K, Niwa K, Watanabe T, Suzuki T. Botulinum toxin complex: a delivery vehicle of botulinum neurotoxin traveling digestive tract. *Intech* 2012, 346: 73–80.

Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmacol Therapeut* 1982, 19: 165–194.

Sakaguchi Y, Hayashi T, Kurokawa K, Nakayama K, Oshima K, Fujinaga Y, Ohnishi M, Ohtsubo E, Hattori M, Oguma K. The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102: 17472–17477.

Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev* 1992, 56: 80–99.

Schocken-Iturrino RP, Avila FA, Berchielli SCP, Filho AN. First case of type A botulism in zebu (*Bos indicus*). *Vet Rec* 1990, 126: 217–218.

Sebahia M, Peck MW, Minton NP, Thomson NR, Holden MT, Mitchell WJ, Carter AT, Bentley SD, Mason DR, Crossman L, Paul CJ, Ivens A, Wells-Bennik MH, Davis IJ, Cerdeño-Tárraga AM, Churcher C, Quail MA, Chillingworth T, Feltwell T, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Jagels K, Larke N, Maddison M, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, White B, Whithead S, Parkhill J. Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome Res* 2007, 17: 1082–1092.

Seddon HR. Bulbar Paralysis in cattle due to the action of a toxicogenic *Bacillus*, with a discussion on the relationship of the condition to forage poisoning (botulism). *J Comp Pathol Therap* 1922, 35: 147–190.

Selby K, Mascher G, Somervuo P, Lindström M, Korkeala H. Heat shock and prolonged

heat stress attenuate neurotoxin and sporulation gene expression in group I *Clostridium botulinum* strain ATCC 3502. PLoS One 2017, 12: e0176944.

Shapiro RL, Hatheway C, Swerdlow DL. Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review. Ann Intern Med 1998, 129: 221–228.

Simpson LL. Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin type A and the cholinergic neuromuscular junction. J Pharmacol Exp Ther 1980, 212: 16–21.

Simpson LL. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. Pharmacol Rev 1981, 33: 155–188.

Skarin H, Håfström T, Westerberg J, Segerman B. *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. BMC Genomics 2011, 12: 185.

Smith TJ, Lou J, Geren IN, Forsyth CM, Tsai R, LaPorte SL, Tepp WH, Bradshaw M, Johnson EA, Smith LA, Marks JD. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. Infect Immun 2005, 73: 5450–5457.

Smith TJ, Hill KK, Foley BT, Detter JC, Munk AC, Bruce DC, Doggett NA, Smith LA, Marks JD, Xie G, Brettin TS. Analysis of the neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* A1-A4 and B1 strains: BoNT/A3, /Ba4 and /B1 clusters are located within plasmids. PLoS One 2007, 2: e1271.

Sobel J, Tucker N, Sulka A, McLaughlin J, Maslanka S. Foodborne botulism in the United States, 1990–2000. Emerg Infect Dis 2004, 10: 9.

Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. Int J Syst Bacteriol 1988, 38: 375–381.

Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Genetic confirmation of identities of neurotoxicogenic *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* implicated as agents of infant botulism. J Clin Microbiol 1988, 26: 2191–2192.

Swedberg J, Wendel TH, Deiss F. Wound botulism. West J Med 1987, 147: 335–338.

Swenson JM, Thornsberry C, McCroskey LM, Hatheway CL, Dowell VR jr, Susceptibility of *Clostridium botulinum* to thirteen antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1980, 18: 13–19.

Tacket CO, Shandera WX, Mann JM, Hargrett NT, Blake PA. Equine antitoxin use and other factors that predict outcome in type A foodborne botulism. *Am J Med* 1984, 76: 794–798.

Theiler A. Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa. *Onderstepoor J Vet* 1927, 12: 821–1361.

Tiedeken N, Budacki R, Shaffer G, Pahys J. Open tibial pilon fracture with wound botulism exacerbated by aminoglycoside antibiotic beads. *Foot Ankle Int* 2014, 35: 626–630.

Torrens JK. *Clostridium botulinum* was named because of association with “sausage poisoning”. *BMJ* 1998, 10: 151.

Townes JM, Cieslak PR, Hatheway CL, Solomon HM, Holloway JT, Baker MP, Keller CF, McCroskey LM, Griffin PM. An outbreak of type A botulism associated with a commercial cheese sauce. *Ann Intern Med* 1996, 125: 558–563.

Tsukamoto K, Tomoko K, Mukamoto M, Takeuchi K, Ihara H, Saito M, Kozaki S. Binding of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins. *J Biol Chem* 2005, 280: 35164–71.

Umeda K, Seto Y, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. *J Clin Microbiol* 2009, 47: 2720–2728.

Vidal JE, Chen J, Li J, McClane BA. Use of an EZ-Tn5-based random mutagenesis system to identify a novel toxin regulatory locus in *Clostridium perfringens* strain 13. *PloS One* 2009, 4: e6232.

Wang ST, Setlow B, Conlon EM, Lyon JL, Imamura D, Sato T, Setlow P, Losick R, Eichenberger P. The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 2006, 358: 16–37.

Werner SB, Passaro D, McGee J, Schechter R, Vugia DJ. Wound botulism in California, 1951–1998: recent epidemic in heroin injectors. *Clin Infect Dis* 2000, 31: 1018–1024.

Whitlock RH, McAdams S. Equine botulism. *Clin Tech Equine Pract* 2006, 5: 37–42.

Woodburn MJ, Somers E, Rodriguez J, Schantz EJ. Heat inactivation rates of botulinum toxins A, B, E and F in some foods and buffers. *J Food Sci* 1979, 44: 1658–1661.

Xu D, Seghezzi N, Esnault C, Virolle M-J. Repression of antibiotic production and sporulation in *Streptomyces coelicolor* by overexpression of a TetR family transcriptional regulator. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76: 7741–7753.

Yamasaki S, Baumeister A, Binz T, Blasi J, Link E, Cornille F, Roques B, Fykse EM, Südhof T, Jahn R, Niemann H. Cleavage of members of the Synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulin neurotoxins and tetanus toxin. *J Biol Chem* 1994, 269: 12764–12772.

Zhang Z, Hintsala H, Chen Y, Korkeala H, Lindström M. Plasmid-borne type E neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* strains. *Appl Environ Microbiol* 2013, 79: 3856–3859.

Zhang Z, Korkeala H, Dahlsten E, Sahala E, Heap JT, Minton NP, Lindström M. Two-component signal transduction system CBO0787/CBO0786 represses transcription from botulinum neurotoxin promoters in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *PLoS Pathog* 2013, 9: e1003252.

Zhang Z, Dahlsten E, Korkeala H, Lindström M. Positive regulation of botulinum neurotoxin gene expression by CodY in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *Appl Environ Microbiol* 2014, 80: 7651–7658.

Zhou Y, Sugiyama H, Nakano H, Johnson EA. The genes for the *Clostridium botulinum* type G toxin complex are on a plasmid. *Infect Immun* 1995, 63: 2087–2091.